

Université de Montréal

**HTDE1 : CARACTÉRISATION, LOCALISATION ET POTENTIEL
TRANSFORMANT D'UN MEMBRE D'UNE NOUVELLE
FAMILLE DE PROTÉINES**

par

Michela Bossolasco

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en biologie moléculaire

Novembre 2005

© **Michela Bossolasco, 2005**



QH

506

U54

2006

V. 010

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**HTDE1 : CARACTÉRISATION, LOCALISATION ET POTENTIEL
TRANSFORMANT D'UN MEMBRE D'UNE NOUVELLE
FAMILLE DE PROTÉINES**

Présentée par :
Michela Bossolasco

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

[Redacted Name]

président-rapporteur

[Redacted Name]

directeur de recherche

[Redacted Name]

membre du jury

[Redacted Name]

[Redacted Name]

représentant du doyen de la FES

Résumé

L'objectif de ce travail consistait à caractériser, localiser et étudier le potentiel oncogénique de hTDE1, un des membres de la famille TDE1/TMS. Lors d'études précédentes, nous avons isolé *TDE1*, un nouveau gène, surexprimé dans les tumeurs testiculaires de souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome (Py-LT). En comparant la séquence de *TDE1* aux banques de données disponibles, aucune homologie avec des gènes à fonctions connues n'a pu être identifiée. Mais la séquence du gène murin utilisée comme sonde reconnaît quatre différents transcrits sur de l'ARN de placenta humain. Ce résultat suggérait donc la présence, chez l'humain, de séquences homologues à *TDE1*. Nous avons donc cloné la séquence codante de *hTDE1* à partir d'une librairie de cDNA provenant de placenta humain. Depuis, de la levure à l'humain, plusieurs autres gènes homologues, localisés sur différents chromosomes, ont été identifiés, permettant la création d'une nouvelle famille de protéines dont les fonctions restent à ce jour inconnues.

L'analyse de la séquence protéique de hTDE1 révèle la présence de plusieurs domaines hydrophobiques potentiellement transmembranaires. Nous avons démontré que la protéine se localise à la membrane plasmique, et que la translocation de hTDE1 à son site final dépend d'une séquence signal présente en N-terminal de la protéine. Cette localisation membranaire suggère que hTDE1 pourrait permettre la transduction d'un signal de l'environnement extracellulaire à l'intérieur de la cellule.

Nous avons entrepris de caractériser l'expression de *hTDE1* dans différents tissus et lignées cellulaires dérivées de tissus normaux et tumoraux. Nous avons démontré l'expression ubiquitaire de l'ARN messager de *hTDE1*. L'analyse d'expression effectuée sur des tumeurs pulmonaires humaines et leurs tissus normaux respectifs à

permis de démontrer que *hTDE1* était surexprimé dans les tissus tumoraux, suggérant un rôle du gène dans le processus de tumorigénèse. Nous avons localisé le gène sur le chromosome 20, en région q13.1-13.3. Cette portion chromosomique, bien qu'amplifiée dans certains types de tumeurs, ne semble pas l'être dans le cancer du poumon, suggérant qu'un autre mécanisme pourrait être à l'origine de la surexpression du messager de *hTDE1*.

Nous avons enfin voulu déterminer l'impact d'une surexpression de *hTDE1* sur différents aspects du processus de transformation cellulaire. L'expression du gène dans des cellules Rat-1 n'a pas d'effet sur le taux de prolifération cellulaire, les propriétés d'adhésion, de migration et le potentiel envahissant des cellules. En outre, *hTDE1* ne semble pas immortaliser les cellules *in vitro*. Par contre, les cellules deviennent résistantes à l'apoptose induite par l'étoposide ou la déplétion de sérum. De plus, l'expression de *hTDE1* induit la perte d'inhibition de contact densité dépendante, altérant donc certains des paramètres habituellement affectés lors de la transformation cellulaire. Enfin, les cellules Rat-1 exprimant *hTDE1* lorsque injectées en sous-cutanées dans des souris nues, induisent la formation de tumeurs suggérant un potentiel oncogénique de *hTDE1 in vivo*.

Cet ouvrage décrit donc le clonage, la caractérisation et la localisation d'une nouvelle protéine, dont la surexpression permet d'altérer certaines caractéristiques cellulaires, favorisant ainsi la transformation cellulaire *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.

Mots clés: *hTDE1*; chromosome 20; surexpression; cancer du poumon; apoptose; transformation; tumorigénèse.

Abstract

The principle aim of this work was to characterize, locate and study the oncogenic potential of hTDE1, one of the TDE1/TMS family members. Previously, we isolated *TDE1*, a new gene overexpressed in testis tumors derived from transgenic mice carrying large T antigen of polyoma virus (Py-LT). When comparing *TDE1* sequence with available databases, no genes significantly homologous could be identified. Using the mouse sequence as a probe, we successfully identify four different *TDE1* related transcripts expressed in human placenta, suggesting the existence of human homologues of the *TDE1* gene. Several *hTDE1* cDNAs were cloned by screening a human placental cDNA library and sequenced. Since then, several other homologous genes, from yeast to human, have been identified, allowing the creation of a new family of proteins whose function remains poorly defined.

Protein sequence analysis revealed the presence of several hydrophobic regions indicative of transmembrane α -helices domains. Here we show that this protein is localized to the plasma membrane, and that hTDE1 translocation to its final site depends on a signal peptide present at the N-terminus of the protein. The hTDE1 membrane location suggests the protein could represent a link between the extracellular environment and the inside of the cell.

We further analyzed *hTDE1* messenger RNA expression patterns in several normal tissues, tumor tissues and cell lines derivatives, and showed that *hTDE1* mRNA was ubiquitously expressed in all tissues and cell lines. However, when comparing human normal lungs with lung tumor tissues, *hTDE1* was overexpressed in the latter, suggesting the gene might be involved in the transformation process. The *hTDE1*

chromosomal localization was determined to be 20q13.1-13.3. This region is known to be amplified in several cancers, but has never been described to be amplified in lung tumors suggesting that other mechanisms might be involved in *TDE* gene overexpression in these pathologies.

Using appropriate expression vectors, *hTDE1* coding sequence was stably transfected to assess whether *hTDE* overexpression affects any of the phenotypes associated with oncogenic transformation. *HTDE1* overexpression in Rat-1 fibroblasts was found to not interfere with cellular proliferation rates, cellular adhesion, migration and invasiveness potential. Moreover, *hTDE1* does not appear to immortalize cells *in vitro*. However, cells became resistant to apoptosis induced by etoposide or serum starvation, and lost density dependent contact inhibition, suggesting *hTDE1* expression, by altering some of the cancer hallmarks, can contribute to cellular transformation. Lastly, when injected in nude mice, Rat-1 cells expressing *hTDE1* coding sequences were able to induce tumor formation suggesting an *in vivo* tumorigenic potential of the gene.

In summary, this work describes the cloning, characterization, and the localization of a new protein which, when overexpressed, contributes to cellular transformation *in vitro* and tumor formation *in vivo*.

Key words: *hTDE1*; chromosome 20; overexpression; lung cancer; apoptosis; transformation; tumorigenesis.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xviii

INTRODUCTION : le cancer..... 1

1.0 Le cancer au plan cellulaire..... 3

1.1 Classification des gènes cibles dans le processus de transformation... 4

1.1.1 Les oncogènes..... 4

1.1.2 Les gènes suppresseurs de tumeur 4

1.1.3 Les gènes de stabilité..... 7

1.2 Différents mécanismes d'altérations moléculaires..... 8

1.2.1 Altérations génétiques..... 9

1.2.1.1 Mutations ponctuelles..... 9

1.2.1.2 Réarrangements majeurs..... 10

Les translocations

Les délétions

Les amplifications

Perte ou gain de chromosomes

1.2.2 Carcinogenèse virale.....	12
---------------------------------	----

1.2.3 Altérations épigénétiques.....	15
--------------------------------------	----

2.0 La cancérogenèse en plusieurs étapes	21
---	-----------

2.1 Transformation <i>in vitro</i>	21
--	----

2.2 Transformation <i>in vivo</i> menant au cancer.....	23
---	----

2.3 Principales acquisitions de la cellule lors de la progression tumorale.....	24
--	----

2.3.1 Indépendance des signaux de croissance.....	24
---	----

2.3.2 Insensibilité aux signaux antiprolifératifs.....	31
--	----

2.3.3 Résistance à l'apoptose.....	34
------------------------------------	----

2.3.4 Prolifération incontrôlée.....	40
--------------------------------------	----

2.3.5 Angiogenèse.....	45
------------------------	----

2.3.6 Invasion des tissus et métastases.....	48
--	----

3.0: Systèmes modèles et progression tumorale : le modèle de souris.....	54
---	-----------

3.1 Souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T

du virus de polyome.....	57
---------------------------------	-----------

3.1.1 Le virus de polyome.....	57
--------------------------------	----

3.1.2 Les souris transgéniques porteuses de LT-Ag.....	61
--	----

3.1.3 Les souris transgéniques MT-PVLT-10 utilisées comme modèle d'étude du processus de progression tumorale.....	63
4.0 La famille de protéines TDE1/TMS	66
5.0 Les objectifs de ce travail.....	68
6.0 Article 1.....	71
The Human <i>TDE</i> Gene Homologue : Localization to 20q13.1-13.3 and Variable Expression in Human Tumor Cell Lines and Tissue.....	72
Abstract.....	73
Introduction.....	74
Materials and Methods.....	76
Results.....	81
Discussion.....	86
Acknowledgements.....	91
References.....	92
7.0 Article 2.....	108
Human TDE1, a TDE1/TMS family member, inhibits apoptosis <i>in vitro</i> and stimulates <i>in vivo</i> tumorigenesis.....	109
Abstract.....	110

Introduction.....	111
Results.....	114
Discussion.....	120
Materials and Methods.....	126
Acknowledgements.....	138
References.....	139
DISCUSSION.....	154
8.0 Discussion.....	155
8.1 Clonage de <i>hTDE1</i> , l'homologue humain du gène <i>TDE1</i> et membres de la famille TDE1/TMS.....	156
8.2 Structure et localisation cellulaire de la protéine.....	161
8.3 Caractérisation de l'expression de <i>hTDE1</i> dans différents tissus et localisation chromosomique du gène codant pour hTDE1.....	169
8.4 Étude du rôle de <i>hTDE1</i> dans le processus de transformation.....	174
8.5 Activité transformante de <i>hTDE1 in vitro</i>	175
8.6 Activité transformante de <i>hTDE1 in vivo</i>	184
8.7 Conclusion et perspectives.....	186
ANNEXES.....	190
BIBLIOGRAPHIE DE L'INTRODUCTION ET DE LA DISCUSSION.....	191

LISTE DES TABLEAUX**ARTICLE 2**

Table 1 :	Summary of TDE1/TMS family members and comparison of human and mouse family members.....	145
-----------	---	-----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 :	Le cycle cellulaire.....	25
Figure 2 :	Exemple d'interactions entre différentes voies de signalisation mitogéniques.....	30
Figure 3 :	Mécanisme général de l'apoptose cellulaire.....	35
Figure 4 :	Génome du virus de polyome.....	58

ARTICLE 1

Figure 1 :	Expression of <i>TDE</i> sequences in human placenta.....	100
Figure 2 :	Nucleotide sequence of the human <i>TDE</i> mRNA.....	101
Figure 3 :	Amino acid sequence of human <i>TDE</i> protein.....	102
Figure 4 :	Amino acid sequence homology between the human and mouse <i>TDE</i> proteins.....	103
Figure 5 :	Localization of the human <i>TDE</i> gene by fluorescence in situ hybridization to the q13.1-13.3 region of human chromosome 20.....	104
Figure 6 :	Expression of human <i>TDE</i> in breast tumor cell lines.....	105
Figure 7 :	Expression of the human <i>TDE</i> gene in tumor cell lines.....	106
Figure 8 :	Expression of human <i>TDE</i> in lung cancer.....	107

ARTICLE 2

Figure 1 :	Hypothetical structure of hTDE1 protein and Western and
-------------------	---

	Northern blot analysis.....	146
Figure 2:	Sub-cellular localization of hTDE1.....	147
Figure 3:	Foci formation and cell proliferation assay.....	148
Figure 4:	Immortalization assay.....	149
Figure 5:	Cellular migration and invasion assay	150
Figure 6:	Apoptosis assay.....	151
Figure 7:	DNA ladder and determination of hypodiploid DNA content.....	152
Figure 8:	Nude mice xenografts.....	153

CONCLUSION

Figure 5:	Glycosylation de la protéine hTDE1	164
------------------	--	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAMs:	Adamalysin-related membrane proteases
ADN:	acide déoxyribonucléique
aFGF:	acidic Fibroblast Growth Factor
AIGP1:	Axotomy-Induced Glycosylated Protein 1
ALT:	Alternative Lengthening of Telomeres
Apaf1:	Apoptotic protease activating factor 1
APC:	Adenomatosis Polyposis Coli
ARN:	acide ribonucléique
ASPP:	Apoptotic-Stimulating Proteins of p53
ATM:	Ataxia Telangiectasia, Mutated
ATR:	ATM- and Rad3-Related
AzaC:	Aza-2'-deoxycytidine
Bax:	Bcl-2 associated x protein
Bak:	Bcl-2 antagonist/killer
BER:	Base Excision Repair
Bid:	BH-3 interacting DD protein
Bcl-2:	B Cell Lymphoma gene 2
BKPyV:	“BK” Polyomavirus
BMP-1:	Bone Morphogenetic Protein metalloproteinase-1
bFGF:	basic Fibroblast Growth Factor
CAK:	Cdk Activating Kinase

CAM:	Cell Adhesion Molecule
CDK:	Cyclin Dependent Kinase
CIN:	Chromosomal Instability
CKI:	CDK Inhibitor
CRE:	cAMP Responsive Element
CREB:	cAMP Responsive Elements Binding protein
DISC:	Death Inducing Signaling Complex
DR4:	Death Receptor 4
EGF:	Epidermal Growth Factor
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
ESTs:	Expressed Sequence Tags
FADD:	Fas-Associated Death Domain
GFP:	Green Fluorescent Protein
HDAC:	Histone Deacetylase
HER:	Human Epidermal Growth factor Receptor
HGF:	Hepatocyte Growth Factor
HIP1:	Huntington Interacting Protein
HPV:	Human Papilloma Virus
HR:	Homologous Recombination
Hsp70:	Heat shock protein 70
hTDE1:	human Tumor Differentially Expressed
HTLV-1:	Human T-cell Lymphotropic Virus-1
IAPs:	Inhibitors of Apoptosis Proteins
IGF:	Insulin-like Growth Factor

INK4a:	Inhibitor of CDK4
IL-1:	Interleukin-1
JCPyV:	“JC” Polyomavirus
LOH:	Loss Of Heterozigosity
LTR:	Long Terminal Repeat
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
Myc:	avian Myelcytomatosis virus
MMPs:	Matrix Metalloproteinases
MMR:	Mismatch Repair
MMTV:	Mouse Mammary Tumour Virus
NHEJ:	Non Homologous Ends Joining
NER:	Nucleotide excision repair
NSCLC:	Non Small Cell Lung Cancer
PB:	Phenylbutyrate
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDGF:	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K:	phosphatidylinositol-3 Kinase
PTH:	Parathyroid Hormone
PyLT-Ag:	Polyomavirus Large Tumor antigen
Rb:	rétinoblastome
REF:	Rat Embryonic Fibroblast
RSV:	Rous Sarcoma Virus
SCLC:	Small Cell Lung Cancer
SH2:	Src Homology domain 2

Shc:	Src homology 2 and Collagen (α 1) related
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
SREBPs:	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
STASIS:	Stress or Aberrant Signaling-Induced Senescence
SV40LT:	Simian Virus 40 Large Tumor antigen
TCF/LEF-1:	T-Cell Factor/Lymphocyte Enhancer-binding Factor
TDE1:	Tumor Differentially Expressed 1
TGF:	Tumor Growth Factor
TIMPs:	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF:	Tumor Necrosis Factors
TRAIL:	TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand
TSA:	Trichostatin A
TUNEL:	Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling
uPA:	urokinase-type Plasminogen Activator
UV:	rayon ultra-violet
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-3:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
WT1:	Wilm's Tumour

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de thèse, Dr. Anne-Marie Mes-Masson, qui m'a permis d'entreprendre et de terminer mon doctorat dans son laboratoire. Je désire également lui exprimer ma gratitude pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de mes études.

Je remercie Dr. Richard Bertrand et Dr. Abdellah Belmaaza pour m'avoir si souvent concédé leur temps et leurs précieux conseils scientifiques.

Je remercie mes collègues de travail, de mon laboratoire et de l'institut du Cancer. En particulier j'aimerais remercier celles qui, par leur gentillesse, par leur sourire et leur amitié, resteront pour toujours dans mes pensées et dans mon cœur. Merci Louise, merci Karynn, merci Wissal, merci Magda et merci Lise.

Je remercie ma famille au Canada, mes beaux-parents, mon fils Mathieu et surtout mon conjoint Marc-Antoine, qui m'a toujours encouragé lorsque les difficultés semblaient insurmontables, qui m'a rendu la confiance en moi, et qui a su m'accompagner avec amour ces dernières années.

Enfin je remercie, du fond du cœur, ma famille en Italie, mon père, ma mère, et mes sœurs Patrizia et Simona, sans qui je n'aurais pu réaliser ce doctorat. Je leur dédie mon travail, mes efforts et mes résultats. Bien que l'océan nous divise, je suis toujours avec vous dans mes pensées et vous êtes dans mon cœur à chaque instant de ma vie.

INTRODUCTION : le cancer

INTRODUCTION : Le cancer

Afin de permettre à tout organisme multicellulaire de fonctionner de façon optimale, la cellule met en œuvre des mécanismes de contrôle très rigoureux sur la prolifération cellulaire. En effet, chaque cellule faisant partie d'un tissu ou d'un organe est spécialisée pour la fonction qu'elle assume et se doit de respecter, dans l'espace et dans le temps, des règles qui lui sont propres. La prolifération cellulaire, processus très actif durant le développement embryonnaire, est également nécessaire à la survie de l'organisme, car elle assure le renouvellement de certains types cellulaires pendant l'homéostasie tissulaire normale de même que lors de blessures engendrant la perte de masse tissulaire (58). Cependant, cette prolifération ne peut se faire de façon anarchique, mais doit respecter les contraintes imposées par la présence de tissus voisins afin de ne pas perturber le fonctionnement des organes vitaux. Dans le dessein de maintenir le nombre de cellules de l'organisme relativement constant et par conséquent d'en préserver la structure macroscopique, il est primordial de contrôler deux paramètres. Le premier est le coefficient de prolifération: c'est le nombre de cellules engagées en division. Le second est le coefficient de perte, correspondant au nombre de cellules éliminées de l'organisme. Cette perte de cellules est régie, en partie, par un processus de mort cellulaire programmée appelé apoptose. L'apoptose permet d'éliminer sélectivement les cellules superflues de même que les cellules défectueuses potentiellement dangereuses. Il existe donc un équilibre entre le nombre de cellules générées par division cellulaire, et le nombre de cellules éliminées par apoptose.

Or, le cancer résulte principalement d'une perte de contrôle dans la balance de ces deux processus (121). S'ensuit donc une prolifération cellulaire désordonnée,

entraînant à long terme la formation d'une masse tumorale. Certaines cellules en provenance de cette masse tumorale deviendront éventuellement capables de migrer et d'envahir d'autres sites de l'organisme, conduisant finalement à la phase terminale de la maladie.

1.0 Le cancer au plan cellulaire

Au plan cellulaire, c'est l'expression des gènes qui détermine le destin de chaque cellule. Dans le cancer, des altérations géniques de même que des changements épigénétiques vont conduire à l'acquisition par la cellule du phénotype transformé. Les altérations géniques appelées mutations, modifient l'ADN et influencent de façon qualitative ou quantitative le message codé par la séquence affectée. En revanche, les modifications épigénétiques peuvent influencer l'expression génique par différents mécanismes sans en changer pour autant la séquence nucléotidique (216). On estime à un par 2×10^7 divisions cellulaires le taux de mutations pouvant ainsi affecter jusqu'à 10^4 cellules de l'organisme humain; il est donc étonnant qu'un seul individu sur trois développera un cancer durant sa vie. En réalité, différents mécanismes de protection ont été développés afin de corriger les erreurs introduites dans la séquence ou réparer d'éventuelles brisures pouvant modifier le message codé par la séquence d'ADN. L'apparition de la maladie est donc le résultat d'altérations génétiques et épigénétiques qui affecteront la prolifération et la survie de la cellule et qui permettront également à cette dernière d'échapper aux mécanismes de contrôle et de réparation (87).

1.1 Classification des gènes cibles dans le processus de transformation

Il existe trois principales classes de gènes affectés durant la transformation cellulaire: les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur et les gènes de stabilité (357).

1.1.1 Les oncogènes

Les premiers oncogènes ont été identifiés en étudiant des virus capables de provoquer des tumeurs chez l'animal. L'oncogène viral *v-src* en est un exemple. Son mécanisme de transformation sera décrit dans la section 1.2.2 intitulée « Carcinogenèse virale ». Ce qu'il est important de retenir ici est que l'identification de *v-src* représentait une première évidence de la présence d'un gène dans le génome viral pouvant être responsable de la transformation des cellules. La découverte d'une séquence similaire appelée *c-src* et présente dans des cellules normales a permis par la suite d'introduire la notion de proto-oncogène (324). Lorsque *c-src* s'intégrait au génome du virus du sarcome de Rous, il subissait des modifications lui conférant des propriétés transformantes. Le groupe de Weinberg a ensuite démontré que le transfert de l'ADN d'une cellule cancéreuse dans des fibroblastes de souris NIH3T3 induisait une perte d'inhibition de contact semblable à celle que l'on observe chez des cellules transformées par infection virale (308). Puisque le transfert d'ADN de cellules normales ne conférait aucune perte d'inhibition de contact, les cellules cancéreuses devaient donc posséder des gènes transformants dans leur génome. Le même groupe a ensuite identifié dans des

provenant d'un carcinome de vessie, le premier oncogène humain, *H-ras*, que l'on retrouve également dans le virus du sarcome de Harvey (309, 253).

Les oncogènes sont donc dérivés de gènes cellulaires normaux appelés proto-oncogènes. Ils sont généralement impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, et suite à une modification qualitative ou quantitative de leur fonction normale, ils acquièrent leur pouvoir transformant. Quel que soit le type de modification, il s'ensuit un «gain de fonction» qui se traduit par une augmentation de l'activité biologique normale du gène ou par une activité inappropriée dans un contexte inhabituel. Ce «gain de fonction» agit de manière dominante puisque la mutation d'un seul allèle est suffisante à l'apparition du phénotype.

1.1.2 Les gènes suppresseurs de tumeur

La deuxième classe importante de gènes contribuant à la transformation cellulaire est représentée par les gènes suppresseurs de tumeur. En 1971, Alfred G. Knudson a été le premier à émettre l'hypothèse des gènes suppresseurs de tumeur pour expliquer l'existence de deux formes d'une tumeur rétinienne, le rétinoblastome. Une première forme, sporadique et unilatérale, était présente dans 60% des cas, alors que la deuxième forme, familiale et bilatérale, apparaissait en bas âge dans 40% des cas observés. Knudson proposait que deux mutations successives étaient nécessaires à l'apparition d'une tumeur. Dans la forme familiale, une des mutations devait être héritée, l'autre subvenait de manière sporadique, ce qui pouvait expliquer l'apparition précoce et bilatérale de la tumeur (186). Cette hypothèse a été confirmée par Cavenee, par des études de pertes d'hétérozygotie, qui lui ont également permis d'identifier le premier

gène suppresseur de tumeur, le gène du rétinoblastome Rb (49). En parallèle, des études de fusion cellulaire entre cellules normales et cancéreuses démontraient le caractère récessif du phénotype malin. En effet, la fusion des deux types de cellules suggérait la présence chez la cellule normale, de matériel génétique capable de « supprimer » la tumorigénicité des cellules cancéreuses, confirmant donc la présence de gènes suppresseurs de tumeurs (138). Depuis, plusieurs gènes suppresseurs de tumeur ont été identifiés, par exemple p53, APC, WT1.

Contrairement aux oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur ont souvent pour rôle d'inhiber la prolifération cellulaire. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs se traduit par une perte de fonction du gène. Celle-ci est récessive puisqu'il est généralement nécessaire que les deux allèles du gène soient mutés. En effet, lorsqu'un seul des allèles est inactivé, l'allèle intact est encore capable de remplir sa fonction normale. Il a été suggéré que dans le cas de certains gènes suppresseurs de tumeur, la perte d'un seul allèle pourrait fournir à la cellule un avantage sélectif (haploinsuffisance), mais de façon générale, la perte des deux allèles est nécessaire à la transformation cellulaire (291). C'est une des raisons pour lesquelles les formes de prédisposition héréditaire du cancer présentent généralement une mutation de type « perte de fonction » au niveau de l'un des allèles d'un gène suppresseur de tumeur. L'allèle intact va permettre à la cellule de survivre jusqu'à l'apparition d'une seconde mutation nécessaire à l'inactivation complète de la fonction du gène. Une mutation de type « gain de fonction » qui apparaîtrait tôt durant le développement se traduirait probablement par un phénotype embryonnaire létal et ne pourrait pas être héritée par les générations futures (269).

1.1.3 Les gènes de stabilité

Il existe une troisième classe de gènes, les gènes de stabilité, qui sont capables de contribuer à la progression tumorale par un mécanisme différent, mais tout aussi important (357). Leur mission est de conserver le taux de mutation génique au minimum, assurant donc le maintien de l'intégrité du génome. Les gènes de stabilité peuvent participer à différents aspects du maintien de l'intégrité du génome. Certains sont impliqués dans la réparation de l'ADN. Une perte de leur fonction aura pour conséquence une augmentation chez la cellule de lésions non réparées, qui seront conservées après réplication. Parmi les différents systèmes de réparation de dommages à l'ADN, l'on retrouve le système de réparation des mésappariements de bases (MMR), qui corrige les erreurs commises lors de la réplication. Plusieurs gènes contrôlent le MMR, et certains, lorsque mutés, participent au développement de cancers. Par exemple les gènes *hMSH2* et *hMLH1*, respectivement responsables de la reconnaissance et de l'excision des mésappariements, représentent environ 80% des mutations que l'on retrouve dans une forme de prédisposition familiale du cancer, le syndrome de Lynch (260, 215).

Parmi les gènes qui contrôlent d'autres systèmes de réparation, par exemple le système de réparation par excision de bases (BER), ou le système de réparation par excision nucléotidique (NER), différentes mutations ont également été décrites. Par exemple, les gènes *XPC* et *DDB2*, sont tous deux mutés dans la maladie Xeroderma Pigmentosum, et prédisposent à l'apparition du cancer de la peau (350, 155).

Lorsque les dommages à l'ADN sont plus importants, on parle d'instabilité chromosomique (CIN). Dans ce dernier cas, ce sont les systèmes de réparation des

cassures double brin, en particulier la recombinaison homologue (HR) et la jonction non homologue des extrémités de brins (NHEJ) qui sont mises en cause. Les cassures doubles brins qui ne sont pas réparées peuvent entraîner des réarrangements majeurs qui menacent donc l'intégrité du génome. Les réparations des cassures doubles brins mettent en jeu différents gènes, par exemple les gènes codant pour les protéines Ku70 et 80 de même que les gènes *BRCA1*, *BRCA2* et *p53*. Plusieurs de ces gènes participent également à la vérification de l'intégrité du génome en tant que « détecteurs » ou « senseurs » de la présence d'un dommage à l'ADN. Ils permettent ainsi l'arrêt du cycle cellulaire, afin d'éviter la transmission de lésions irréversibles. C'est le cas des gènes *ATR*, *DNA-PK* et *ATM*, ce dernier étant responsable du syndrome de l'Ataxie Téléangiectasie. Lorsque ces gènes deviennent inactifs, le nombre de mutations transmises aux générations suivantes, et susceptibles de modifier la fonction d'un gène quelconque dans la cellule, augmente de façon drastique. Puisque parmi les gènes qui seront altérés, on retrouve également les gènes suppresseurs de tumeurs de même que les oncogènes, toute mutation ou altération des gènes de stabilité favorise la progression tumorale en facilitant l'accumulation de mutations capables d'induire la transformation cellulaire.

1.2 Différents mécanismes d'altérations moléculaires

Il existe différentes façons de modifier la fonction d'un gène. En particulier, il est possible d'altérer la molécule d'ADN en modifiant la séquence nucléotidique, ce qui conduit à la traduction de protéines différentes. On parle alors d'altérations proprement génétiques. Lorsque la séquence nucléotidique reste intacte, mais que l'on modifie

l'activité d'une protéine en changeant son niveau d'expression, on parle alors d'altérations épigénétiques (216, 194).

1.2.1 Altérations génétiques

1.2.1.1 Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles surviennent lorsque lors de la réplication d'un gène, une erreur s'introduit dans la séquence d'ADN et modifie une des bases contenues dans la séquence originale. On distingue différents types de mutations, en particulier la substitution d'une base par une autre, de même que la délétion ou l'insertion d'une base. Les conséquences sont différentes et dépendent du rôle que joue la base affectée dans la fonction de la protéine. Le résultat de la mutation peut également varier, dépendamment du changement accordé au cadre de lecture. On distingue des mutations silencieuses qui n'affecteront pas la séquence protéique et des mutations faux-sens et non-sens qui modifient le résultat de traduction de la séquence génique et par conséquent en altèrent la fonction. Plusieurs mutations ponctuelles sont impliquées dans l'activation des oncogènes. Par exemple, une mutation ponctuelle dans la région transmembranaire de la protéine codée par le gène *v-erbB2* peut transformer le récepteur à activité tyrosine kinase-ligand dépendante, en une tyrosine kinase d'activité constitutive ligand-indépendante. Des mutations faux-sens sont également impliquées dans l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que WT-1 et p53. Des mutations non-sens qui introduisent dans la séquence un codon d'arrêt peuvent également conduire à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que Rb, BRCA1, BRCA2 et APC.

1.2.1.2 Réarrangements majeurs

Lorsque les altérations sur la séquence ne se limitent plus à une ou quelques paires de bases, on parle de réarrangements chromosomiques. Ces mutations impliquent une importante portion de séquence et sont souvent détectables par des techniques de cytogénétique.

Les translocations :

Elles sont le résultat de la juxtaposition aberrante de deux régions chromosomiques distinctes. Les translocations peuvent, par exemple, conduire à l'apparition d'une protéine chimérique possédant maintenant des propriétés transformantes. Par exemple une translocation d'un fragment distal du bras long du chromosome 22 au niveau du bras long du chromosome 9 est à l'origine d'un type de leucémie myéloïde chronique. Cette translocation entraîne la juxtaposition du gène *bcr* présent sur le chromosome 22 et du proto-oncogène *c-abl* présent sur le chromosome 9 et aboutit à l'expression d'une protéine chimérique. L'activité tyrosine kinase de la protéine codée par *c-abl* est ainsi augmentée. Le petit chromosome 22 amputé de ses bras longs a été appelé chromosome Philadelphie et cette anomalie cytogénétique représente la première évidence de ce type de translocation acquise et caractéristique d'une pathologie tumorale (283).

Une translocation peut également conduire à la juxtaposition d'un proto-oncogène et d'une séquence régulatrice particulièrement active, avec comme conséquence une surexpression de la protéine encodée. C'est le cas des lymphomes de Burkitt, caractérisés par des translocations impliquant le chromosome 8 d'une part et les chromosomes 2, 14 ou 22 d'autre part. Ces translocations déplacent l'oncogène *c-myc*

proche des séquences régulatrices actives des molécules d'immunoglobulines aboutissant à une surexpression de c-myc (37).

Les délétions :

Il s'agit de la perte d'une portion plus ou moins importante de chromosome. Les délétions sont à l'origine de la plupart des mutations inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeurs. Elles engendrent habituellement des protéines tronquées ou instables. Les délétions sont à l'origine des LOH (loss of heterozygosity), que l'on retrouve dans de nombreux cancers et qui, dans le cas de tumeurs solides humaines, peuvent engager jusqu'à 20% du génome. On a perte de l'allèle paternel ou maternel d'un gène, suivi d'une mutation dans l'autre allèle. Les LOH se retrouvent généralement sur des «points chauds» où sont localisés des gènes suppresseurs de tumeurs. On peut citer par exemple le cas des gènes *APC* et *P53* dans le cancer colorectal (91).

Les amplifications :

Lors de la réplication, une région d'ADN comportant par exemple un proto-oncogène peut par erreur être amplifiée de nombreuses fois, engendrant ainsi un grand nombre de copies du même gène. Le résultat de cette amplification sera la production massive de la protéine correspondante qui se traduira en activité oncogénique.

Perte ou gain de chromosome :

La perte ou le gain de la totalité d'un chromosome peut engendrer le même type de conséquences que l'on observe dans un contexte de délétion ou d'amplification génique.

1.2.2 Carcinogenèse virale

Les virus jouent un rôle important dans le développement du cancer. Ils représentent, après le tabagisme, le deuxième facteur de risque le plus élevé et sont impliqués plus ou moins directement dans 15 % des cancers humains (38). Plusieurs études épidémiologiques ont permis en effet d'associer certains types de cancer à l'infection de virus humains spécifiques (246). Par exemple, le virus Epstein Barr est associé au lymphome de Burkitt, les virus de l'hépatite B et C sont associés à l'apparition d'hépatocarcinomes humains, et certaines souches de virus du papillome humain (en particulier HPV 16 et HPV 18) sont impliquées dans la genèse du cancer du col de l'utérus. Le virus HTLV-1, associé à l'apparition de la leucémie lymphoïde T de l'adulte, est le seul rétrovirus connu pour jouer un rôle dans la carcinogenèse chez l'humain (111). La nature de l'association entre l'infection virale et l'apparition du cancer est variable. Dans la majorité des cas, il est possible d'identifier la présence d'une partie du génome ou du génome complet du virus, de même que la présence d'antigènes viraux spécifiques dans les cellules provenant de la tumeur. Mais l'apparition du cancer ne représente pas une conséquence inévitable de l'infection virale. Souvent l'infection précède de plusieurs années l'apparition du cancer. De plus, certains cofacteurs semblent être requis, par exemple l'apparition du lymphome de Burkitt est très fréquente dans certaines régions d'Afrique où la malaria est endémique suggérant un lien entre la maladie et l'apparition du lymphome.

De manière générale, suite à l'infection, le virus va intégrer une partie ou la totalité de son génome à l'ADN de la cellule hôte. L'intégration du génome viral aura comme conséquence la transformation de la cellule et ce, par différents mécanismes.

Un premier mécanisme est l'expression d'un oncogène viral pouvant influencer la prolifération de même que la survie cellulaire. Comme mentionné précédemment, le premier oncogène découvert appartenait au génome du virus du sarcome de Rous (RSV). En effet, l'infection par ce virus se traduisait par l'apparition de sarcomes chez le poulet. Peter Duesberg et Peter Vogt furent les premiers à déterminer que le virus RSV contenait l'information nécessaire à l'apparition de la tumeur (80). La séquence responsable, appelé *v-src*, qui fut le premier oncogène identifié, n'était cependant pas requise pour la réplication virale (359). En réalité, l'oncogène *src* représentait la forme modifiée d'un gène normalement présent dans le génome du poulet et capturé par le virus au cours de l'évolution lors de multiples passages dans différentes cellules hôtes. La protéine codée avait une activité tyrosine kinase et était impliquée dans le processus de prolifération cellulaire. L'intégration accidentelle du proto-oncogène dans le génome du virus le priva de ses séquences régulatrices présentes dans la cellule. Maintenant sous le contrôle des régions LTR du virus, l'ARN messager de *src* pouvait être exprimé dix à cent fois plus qu'auparavant. De plus, la séquence subit de nombreuses mutations ponctuelles de même qu'une délétion de sa région C-terminale, ce qui en accentua l'activité catalytique. Nombre d'autres proto-oncogènes intégrés par erreur dans un génome viral auxquels on attribue une fonction transformante ont par la suite été identifiés.

Le virus, en plus d'exprimer un oncogène, peut également induire l'expression d'un facteur viral capable d'activer un proto-oncogène cellulaire ou capable d'inhiber l'activité d'un gène suppresseur de tumeur. Par exemple, chez l'humain, le virus HTLV-1 ne contient pas de proto-oncogènes cellulaires. Il code cependant pour un facteur transcriptionnel, la protéine Tax, capable de moduler l'expression d'une cinquantaine de

gènes de la cellule hôte. Tax lie des éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE) sur le promoteur viral, mais interfère également avec la voie de transcription cellulaire CREB/ATF (319, 103) en induisant par exemple l'expression des BCL-XL et de la cycline D2 (343, 292). De cette façon, la protéine Tax affecte la progression du cycle cellulaire et génère une résistance à l'apoptose. Tax active également NFkB, ce qui aura entre autre pour conséquence de promouvoir l'expression d'un certain nombre de facteurs capables de favoriser la croissance et la survie des lymphocytes, par exemple certaines cytokines (IL-1, IL-2, IL-6) (204). Tax semble également responsable de favoriser une certaine instabilité génomique (229, 220). Tous ces effets sur la cellule hôte auront comme conséquence d'en favoriser la transformation.

D'autres protéines virales, par exemple les protéines E6 et E7 produites lors de l'infection virale par le virus du papillome, vont affecter l'activité de suppresseurs de tumeurs, dans le même dessein de favoriser la transformation de la cellule hôte. Il a été démontré que la protéine E7 produite lors de l'infection virale par le virus du papillome se lie à la forme hypo-phosphorilée de la protéine Rb et l'empêche de s'associer au facteur de transcription E2F (247). E7 lie également d'autres membres de la famille de Rb, comme p107 et p130, de même que les inhibiteurs de CDK p21 et p27, et de cette façon favorise la progression du cycle cellulaire (81, 108). Le même virus va également induire la production d'une autre protéine virale, la protéine E6, qui est capable d'interagir directement avec p53, et d'en causer la dégradation protéosomale (295, 294). La dégradation de p53 aura pour conséquence une perte d'arrêt en G1/S suite à l'apparition de dommages à l'ADN. L'expression concomitante des protéines E6 et E7 favorise donc la transformation des cellules infectées par le virus HPV.

Un deuxième mécanisme de transformation cellulaire par infection virale, que l'on appelle mutagenèse insertionnelle, est principalement dépendant du site d'intégration du virus dans la séquence d'ADN de la cellule hôte. On pense qu'il existe des régions cibles d'intégration pour la molécule virale, ce qui permettrait au virus de transformer la cellule indirectement, sans nécessiter l'expression de protéines virales. En effet, l'intégration de l'ADN viral à l'intérieur d'un gène suppresseur de tumeur aboutira à son inactivation. Si l'intégration a lieu dans les régions régulatrices d'un proto-oncogène, la présence de séquences régulatrices virales peut modifier l'expression normale de la protéine cellulaire et conduire à un début de transformation cellulaire (376).

1.2.3 Altérations épigénétiques

Les altérations épigénétiques sont des mécanismes permettant de modifier l'expression génique sans en altérer la séquence nucléotidique. C'est à Conrad Waddington, dans les années 50, que nous devons l'idée que l'expression génique peut être modifiée par des mécanismes autres qu'un changement dans la séquence d'ADN. En étudiant le développement embryonnaire, Waddington suggéra que la différenciation des cellules qui composent les tissus d'un embryon en développement devait découler d'un changement non pas des gènes que la cellule exprimait, mais de leur patron d'expression. Les gènes restaient donc les mêmes, mais leur niveau d'expression pouvait changer, ce qui permettait à la même cellule en se différenciant, de générer tous les tissus d'un organisme adulte (348). Plusieurs autres évidences suggéraient l'existence d'un mécanisme capable de contrôler l'expression génique sans en altérer la séquence nucléotidique. Mary Lyon en 1962 formulait l'hypothèse d'un mécanisme de

compensation génique propre au chromosome X, aboutissant chez la femme à l'inactivation aléatoire de l'un des deux chromosomes X. Environ 50% des cellules chez la femme exprimaient donc le chromosome X d'origine maternelle, l'autre moitié des cellules n'exprimait que celui d'origine paternelle, ayant pour conséquence l'expression monoallélique des gènes présents sur le chromosome. Cette inactivation était accompagnée d'une méthylation importante au niveau des îlots CpG présents sur le chromosome. Le même phénomène pouvait être observé lors de la mise en place de l'empreinte parentale, où pour un certain gène, seul l'allèle d'origine maternelle ou l'allèle d'origine paternelle peut être exprimée (225).

Puisque la méthylation représentait un mécanisme de contrôle d'expression génique dans l'inactivation du chromosome X et lors de la mise en œuvre de l'empreinte parentale, il était pensable de retrouver ce même phénomène lié aux changements d'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Feinberg et Vogelstein ont été les premiers, en 1983, à démontrer que les cellules tumorales avaient un patron de méthylation différent de celui des cellules normales (92). Il a ensuite été proposé qu'une hyperméthylation des îlots CpG en 5' du gène Rb puisse être à l'origine du développement de rétinoblastomes de type sporadique lorsqu'il était impossible d'associer l'apparition de la maladie à deux événements mutationnels (124). Une méthylation aberrante des îlots CpG a été décrite pour plusieurs autres gènes suppresseurs de tumeur comme p16, p73, ainsi que pour un certain nombre de gènes de stabilité comme hMLH1 ou BRCA1 (86).

Il est intéressant de noter que ces modifications, puisqu'elles n'affectent pas la séquence d'ADN, sont réversibles grâce à l'utilisation d'agents chimiques spécifiques, et représentent donc une cible idéale dans l'intervention thérapeutique (351). Par exemple

les inhibiteurs des enzymes méthyltransférases comme la 5-azacytidine, la 2'deoxy-5-azacytidine, connue aussi sous le nom de Decitabine, de même que les inhibiteurs des acétylases trichostatin (TSA) et phenylbutyrate (PB) utilisés seuls ou simultanément, permettent de réactiver, *in vitro* de même qu'*in vivo*, l'expression génique réprimée par des changements épigénétiques (34, 314).

Parmi les plus importants mécanismes d'altérations épigénétiques, on retrouve la méthylation d'ADN, et la méthylation et la déacétylation des histones. Il a été démontré pour chacun de ces mécanismes, qu'il pouvait affecter la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, de la différenciation, de l'apoptose et en général de la progression tumorale (195, 216, 233, 333, 374).

Le rôle de l'acétylation des histones dans le cancer a été établi par l'utilisation de composés inhibiteurs des HDAC. En effet des cellules transformées mises en présence de ces composés perdent leurs caractéristiques néoplasiques (347, 345, 346).

La méthylation des îlots CpG, au niveau des promoteurs, est un processus nécessaire au développement normal des cellules, et permet de contrôler le niveau d'expression génique. Par contre, une méthylation aberrante peut aboutir à la transformation cellulaire. En effet, l'hyperméthylation d'un promoteur se traduira par une diminution d'expression du gène sous son contrôle. Par conséquent, s'il s'agit du promoteur d'un gène suppresseur de tumeur, celui-ci ne pourra plus exécuter son activité inhibitrice sur la prolifération cellulaire ou de contrôle sur l'intégrité du génome, avec comme conséquence la transformation de la cellule. Un grand nombre d'îlots CpG hyperméthylés ont été découverts dans plusieurs types de cancers. De plus, cette méthylation aberrante a été identifiée sur plusieurs gènes impliqués dans la transformation cellulaire, ce qui permet de confirmer l'existence de ce mécanisme dans

le processus de tumorigénèse (144, 145, 173, 231, 237). Par exemple la méthylation du gène suppresseur de tumeur p16 (INK4a) est un phénomène que l'on rencontre fréquemment dans les cancers humains. Le gène code pour une protéine capable de lier les kinases cyclines dépendantes cdk4 et cdk6, les empêchant donc de s'associer à la cycline D, inhibant ainsi le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Il a été observé que la perte d'expression de p16 permet d'accroître considérablement le nombre de divisions cellulaires chez des cellules provenant d'épithélium mammaire normal. Cette perte d'expression a été associée à une hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène. En effet lorsque les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur de méthylation 5-aza-2'-deoxycytidine (AzadC), il était possible de restaurer l'expression normale de p16 et les cellules présentaient maintenant un arrêt de croissance normal (101). Chez certains types de cancers, par exemple le cancer de la vessie, la méthylation représente le mécanisme dominant d'inactivation de p16, avec une incidence de 70% dans les cancers humains, contre 50% d'inactivation due à des délétions et 7% à des mutations ponctuelles (11).

Dans le cancer de l'ovaire, l'hyperméthylation du promoteur du gène codant pour le récepteur DR4, l'un des récepteurs impliqués dans la réponse à l'apoptose TRAIL dépendante, peut conduire à la résistance des cellules tumorales à l'apoptose. Une certaine corrélation entre la perte d'expression du récepteur et la résistance à l'apoptose TRAIL dépendante dans le cancer de l'ovaire avait déjà été proposée (341). L'analyse d'un certain nombre de lignées cellulaires de cancer de l'ovaire a ensuite permis de démontrer que l'hyperméthylation du promoteur du récepteur DR4 était à l'origine de cette résistance à l'apoptose induite par TRAIL. Lorsque les cellules ont été mises en présence de l'inhibiteur de méthylation AzadC, il était possible de rétablir l'expression

de DR4 de même que la réponse des cellules à l'apoptose induite par TRAIL. L'analyse d'un certain nombre de tissus provenant de cancers ovariens a également permis d'établir que l'hyperméthylation du promoteur de DR4 était présente chez 27% des échantillons, suggérant que cette altération épigénétique pourrait participer à la pathogenèse du cancer de l'ovaire (152).

La méthylation est également tenue responsable du phénomène de perte de l'empreinte génomique (14). Par ce phénomène, la cellule « choisit » d'exprimer seul l'allèle maternel ou paternel d'un gène, et elle transmet ce contrôle de façon héréditaire durant la division cellulaire. Or, une perte de cette empreinte génétique, permettant l'expression contemporaine de l'allèle maternel et paternel a été observée dans différents cancers humains. Le résultat est la surexpression de gènes qui, si impliqués dans la prolifération cellulaire, vont conduire à la transformation cellulaire. C'est par exemple le cas du facteur de croissance IGF-2, pour lequel on observe une perte de l'empreinte génétique chez 45% de patients souffrant de cancer colorectal (65).

La structure de la chromatine est également importante dans la régulation de l'expression de certains gènes. Une région de chromatine très compacte limitera l'accès aux facteurs importants pour la transcription, et aura comme conséquence la répression de l'expression des gènes localisés sur ce segment d'ADN. Chez les eucaryotes, la molécule d'ADN se compacte en s'enroulant autour de structures constituées d'octamères de protéines appelées histones. La partie N-terminale de chaque histone est susceptible de subir des modifications qui vont influencer l'organisation du chromosome de même que la régulation de l'expression de certains gènes. La méthylation de cette queue N-terminale joue un rôle important dans le maintien de la structure de la chromatine. Par exemple, la méthylation de la lysine-4 dans l'histone H3 s'accompagne

d'une configuration ouverte de la chromatine, favorisant l'expression génique. Au contraire, la méthylation de la lysine-9 est associée à la présence d'une chromatine condensée et compacte, peu permissive à l'expression génique. L'acétylation des lysines présentes dans la portion N-terminale des histones, représente un deuxième mécanisme de contrôle de la configuration de la chromatine. Il a été suggéré que lorsque les lysines présentes en N-terminal sont déacétylées, les histones sont chargés positivement et donc attirés par les charges négatives présentes sur la molécule d'ADN. Ceci aura pour conséquence l'apparition d'une chromatine compacte, peu propice à l'expression génique. Au contraire, l'acétylation des lysines éliminerait les charges positives sur les histones, qui vont s'éloigner de la molécule d'ADN, facilitant ainsi la transcription génique (231). Il a été proposé que les modifications sur les protéines histones qui sont susceptibles d'influencer l'expression génique suivent des règles précises; elles ont été regroupées sous la définition de «code d'histone». Ce code permettrait d'influencer le recrutement des complexes protéiques impliqués dans la transcription (3, 169). De plus, le «code d'histones» interagirait également avec le mécanisme de méthylation différentielle des promoteurs de gènes. La méthylation d'ADN, la déacétylation des histones et la méthylation des histones pourraient collaborer à réprimer l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeur par le biais de la condensation de chromatine (22, 39). Ceci suggère, en ce qui concerne les gènes impliqués dans le développement de tumeurs, l'existence d'une coordination dans la mise en œuvre des mécanismes épigénétiques de transformation cellulaire (231). Cameron et ses collègues ont utilisé un inhibiteur des méthyltransférases comme la 2'deoxy-5-azacytidine et un inhibiteur des HDAC comme le TSA sur des cellules cancéreuses de carcinome colorectal. Ils ont pu démontrer qu'il était plus facile de rétablir l'expression d'un certain nombre de gènes

suppresseurs de tumeurs, connus pour être hyperméthylés sur leurs promoteurs, lorsque les deux inhibiteurs étaient utilisés simultanément, suggérant donc une interaction entre la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones (39). Des résultats semblables ont également été obtenus pour des lignées cellulaires dérivées d'autres types de cancers et d'autres inhibiteurs de HDAC, confirmant donc une synergie des différents mécanismes d'altération épigénétique dans certains cancers (109, 270).

2.0 La cancérogenèse en plusieurs étapes

Plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs ont été associés à différents types de tumeurs. Pour certains d'entre eux on connaît également les mécanismes par lesquels la fonction primaire du gène a été perturbée. Cependant, on sait maintenant qu'un seul évènement n'est pas suffisant pour transformer une cellule saine en cellule cancéreuse. Le cancer est le résultat d'une succession d'altérations génétiques ou épigénétiques permettant l'expansion clonale de la cellule néoplasique (219, 242).

2.1 Transformation *in vitro*

Les premières expériences effectuées *in vitro* avec des cellules de rongeurs afin de déterminer le nombre minimum de mutations nécessaires à la transformation cellulaire semblaient démontrer qu'il suffisait d'un oncogène, introduit dans le génome d'une cellule normale, pour obtenir un phénotype transformé. La réalité s'avéra différente lorsque l'on comprit que les cellules utilisées pour l'expérience ne pouvaient être considérées comme étant totalement normales. Il s'agissait en effet de fibroblastes

de rat, immortalisés spontanément, qui avaient donc acquis la capacité de proliférer indéfiniment (238). Ces cellules avaient donc déjà franchi une étape essentielle à la transformation. Il a été démontré qu'en fait un minimum de deux oncogènes était nécessaire à la transformation de cellules primaires normales de rat (20, 196); (286). Par exemple la transfection simultanée de l'oncogène *ras* et de l'oncogène *myc* ou de l'antigène grand T du virus de Polyome était requise afin de transformer des fibroblastes embryonnaires de rat (196). Lorsque le même type d'expérience a été effectué sur des cellules humaines, la présence simultanée de trois événements génétiques devenait indispensable (131). Pour le démontrer, Hahn et ses collègues utilisèrent deux différents types de cellules humaines pour leurs expériences: des fibroblastes humains et des cellules épithéliales humaines normales. Ils ont transfecté dans la même cellule, le gène codant pour la sous-unité catalytique de l'enzyme télomérase (hTERT), un gène *ras* activé (H-*ras*V12) et l'antigène grand T du virus simien SV40 (SV40LT). L'expression concomitante de ces trois gènes, dans les deux différents types cellulaires utilisés, était alors suffisante pour conférer un phénotype malin aux cellules normales. Bien que les auteurs aient utilisé trois gènes pour obtenir des cellules transformées, en réalité, quatre composantes cellulaires différentes furent affectées durant l'expérience. Par l'expression de hTERT, les cellules devinrent capables d'échapper à la sénescence en maintenant constante la longueur de leurs télomères. L'antigène grand T du virus de SV40, en interagissant avec les protéines p53 et Rb, affecta les mécanismes de réparation d'ADN de même que la régulation du cycle cellulaire. Enfin l'expression du gène *ras* permit à la cellule de devenir indépendante des facteurs de croissance. Ensemble, le dérèglement de ces quatre composantes coopérait donc à l'acquisition du phénotype malin. La transformation cellulaire dépendait de l'ordre avec lequel les différents gènes étaient

transfectés, et les résultats n'étaient pas reproductibles par l'utilisation de gènes différents capable d'affecter les mêmes composantes. Il n'en demeure pas moins que l'expérience a permis de démontrer la possibilité de transformer une cellule normale en n'en modifiant que quelques caractéristiques. Elle a également permis de montrer que la collaboration entre les différents gènes était essentielle au processus de transformation cellulaire. En effet, seule la présence de plusieurs accidents génétiques, différents mais complémentaires, est capable de conduire à la tumorigénèse. Un nombre minimal d'évènements transformants devront donc se succéder lors de la tumorigénèse: on parle de progression tumorale à plusieurs étapes.

2.2 Transformation *in vivo* menant au cancer

La situation *in vivo* est encore plus complexe. Un nombre plus important de mutations est en effet nécessaire à l'apparition d'une tumeur maligne, allant de 4 à 6 chez l'humain (276). À l'intérieur de l'organisme, la cellule devra se confronter à des obstacles supplémentaires. Elle devra en effet échapper à la surveillance du système immunitaire. Suite au processus de prolifération, les besoins en nutriments et oxygène de la masse cellulaire augmenteront, ce qui nécessitera la mise au point d'un nouveau système d'approvisionnement sanguin. De plus, afin de coloniser d'autres sites dans l'organisme, la cellule va devoir traverser de nombreuses barrières physiques représentées par les parois des différents vaisseaux sanguins et lymphatiques et des différents organes cibles. Compte tenu du contexte *in vivo*, de l'existence d'une centaine de différents types de cancers, distribués sur différents organes et d'autant d'altérations génétiques, le processus de transformation peut paraître un phénomène très complexe.

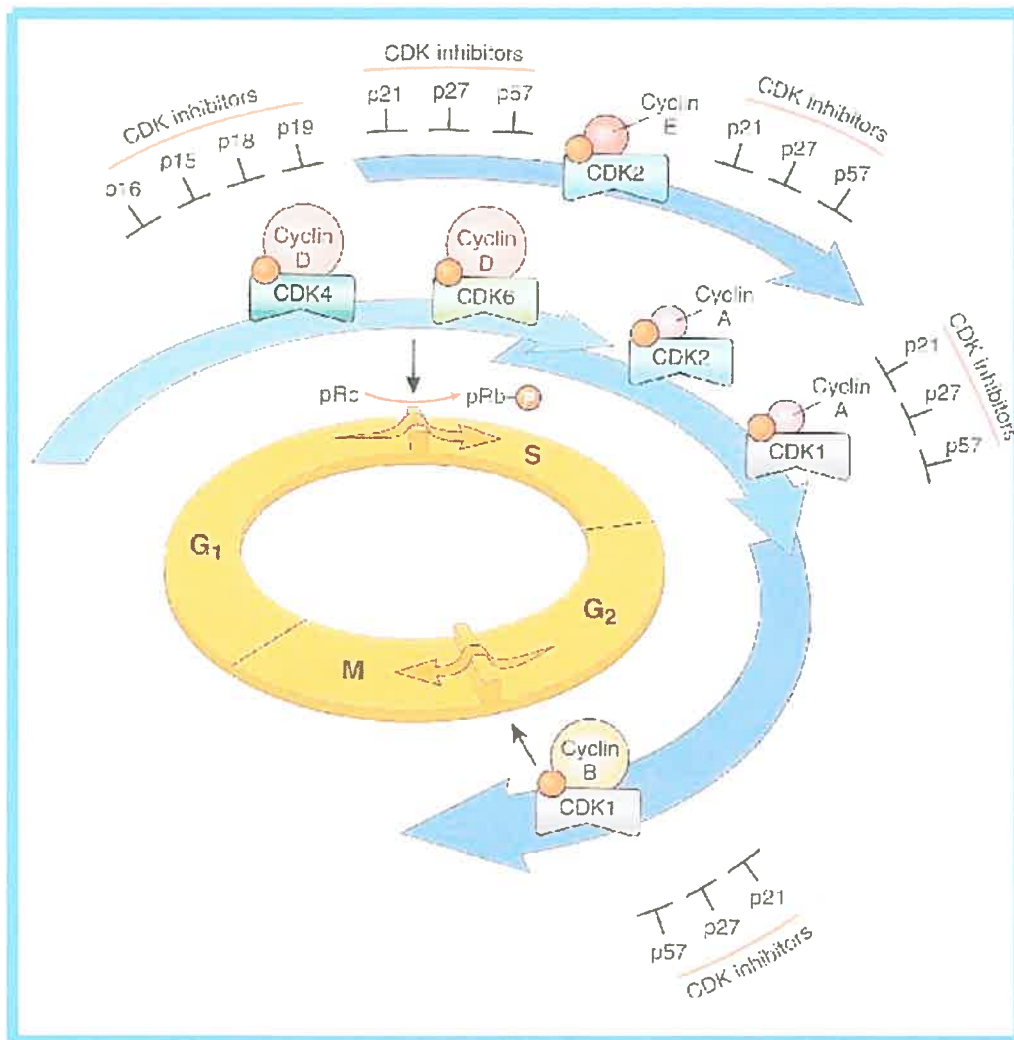
En réalité, il est possible de résumer tous les événements responsables de la transformation cellulaire menant au cancer, à la perturbation de six composantes principales de la physiologie de la cellule (134). Celle-ci doit en effet devenir indépendante des signaux de croissance, doit devenir insensible aux signaux antiprolifératifs, doit résister à l'apoptose, doit acquérir un potentiel réplicatif infini, c'est-à-dire devenir immortelle, doit être capable d'induire l'angiogenèse et doit enfin pouvoir métastaser et envahir d'autres tissus. L'acquisition par la cellule de ces différents traits résume et simplifie conceptuellement le processus de transformation. En effet, ces six nouvelles capacités se retrouvent chez la plupart sinon tous les types de cancers humains. Chacune d'elles représente un succès dans la bataille contre un des mécanismes de défense de l'organisme, et s'achève par la transformation de la cellule et l'apparition d'une tumeur maligne.

2.3 Principales acquisitions de la cellule lors de la progression tumorale

2.3.1 Indépendance des signaux de croissance

La prolifération cellulaire est normalement réglementée de manière très stricte. On appelle cycle cellulaire, l'ensemble des étapes d'une division cellulaire (figure 1). Ce cycle comporte deux phases fonctionnelles, la phase S (Synthèse) qui permet à la cellule de répliquer son ADN nécessaire à sa division, et la phase M (Mitose) où la cellule se divise physiquement. Deux phases préparatoires, la phase G1 qui précède la phase S et la phase G2 qui précède la phase M, permettent à la cellule de synthétiser tout le matériel nécessaire pour compléter les phases S et M. Il existe une phase supplémentaire

Figure 1: Le cycle cellulaire



Tiré de: Pathologie des tumeurs, Carcinogénèse: transformation cellulaire. Ivan Stamenkovic Institut de pathologie, Université de Lausanne

que l'on appelle G0, pendant laquelle la cellule reste métaboliquement active mais ne se divise pas. La plupart des cellules dans un organisme adulte sont en phase G0. La cellule peut rester en G0 ou bien entrer en phase G1 et se diviser. Lors du passage d'une phase à l'autre il existe des points de contrôle qui permettent à la cellule de vérifier si toutes les conditions optimales au passage à la phase suivante sont présentes (139).

La présence de signaux de croissance mitogéniques va permettre le passage d'un état quiescent à un état prolifératif actif. Aucune cellule normale n'est capable de proliférer en l'absence de ces signaux. Ils sont communiqués à la cellule par le biais de récepteurs membranaires, capables d'interagir d'une part avec des facteurs de croissance extracellulaires diffusibles et d'autre part avec des molécules de la matrice extracellulaire ou présentes à la surface de cellules voisines. La liaison du ligand sur son récepteur va permettre l'activation de voies de transduction à l'intérieur de la cellule. La transmission de ce signal permet l'activation d'une cascade de transmetteurs de signaux, qui va subséquentment modifier l'expression de gènes impliqués dans le processus de prolifération cellulaire, en particulier dans la progression du cycle cellulaire. Une des caractéristiques de la cellule tumorale est précisément de se rendre indépendante des signaux de croissance. Elle sera capable de se diviser également dans un environnement peu propice à la prolifération, c'est-à-dire en l'absence d'un signal physiologique de croissance. Dans ce dessein, la cellule cancéreuse peut adopter plusieurs stratégies moléculaires à différents niveaux de contrôle dans la cellule.

Le premier niveau de contrôle est représenté par les facteurs de croissance extracellulaires. Ces facteurs peuvent provenir de la cellule elle-même (signalisation autocrine) ou de cellules voisines (signalisation paracrine). Lorsque le signal provient d'une autre cellule, il peut s'agir du même type de cellule (signalisation homotypique)

ou d'un type de cellule différent (signalisation hétérotypique). Lors de la transformation, la cellule cancéreuse synthétisera elle-même les facteurs auxquels elle est sensible, créant ainsi une boucle de rétroaction positive qui la rendra donc indépendante de la stimulation provenant de son environnement. On retrouve ce type de mécanisme dans de nombreux carcinomes qui produisent $TGF\alpha$ (73, 187) de même que dans certains carcinomes et glioblastomes qui produisent PDGF (212, 224, 239). Il a également été suggéré que la cellule cancéreuse pourrait induire la synthèse anormale de facteurs de croissance de la part de ses cellules voisines. La cellule cancéreuse pourrait ainsi modifier son environnement dans le dessein de favoriser sa propre prolifération (316).

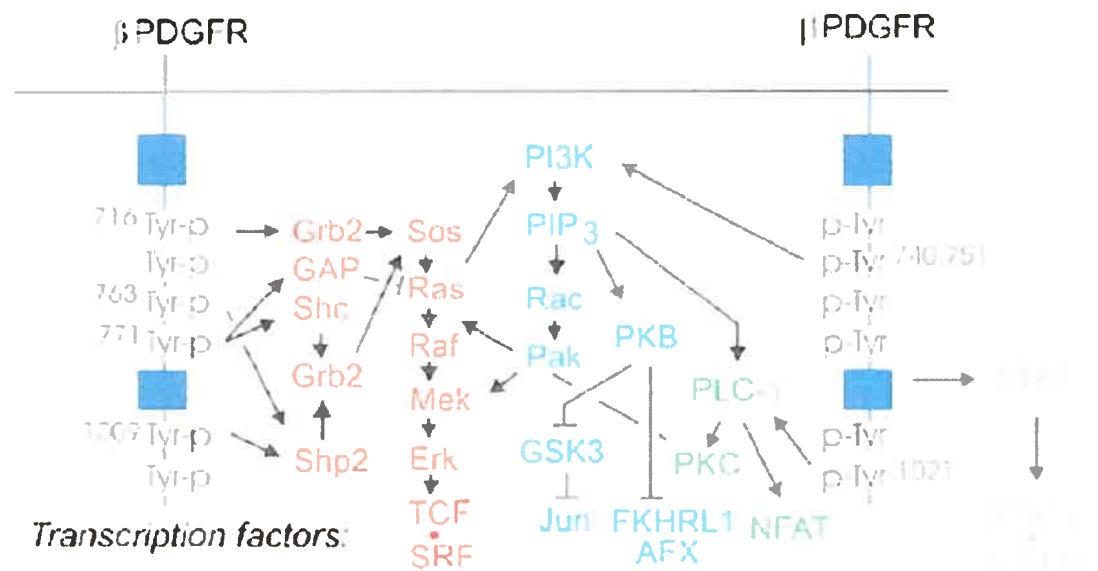
Un deuxième niveau de contrôle est représenté par les récepteurs membranaires. Ce sont eux qui lient les facteurs de croissance et permettent ainsi l'activation des voies de transduction intracellulaires. Il s'agit la plupart du temps de récepteurs qui ont une activité tyrosine kinase. On retrouve parmi ces protéines la famille de récepteurs des facteurs de croissance épithéliale HER (282). Plusieurs membres de cette famille sont surexprimés dans de nombreux cancers. C'est le cas du récepteur ErbB1, surexprimé dans le cancer de la vessie, de la tête et du cou, du rein, du poumon et de la prostate, du récepteur ErbB3 surexprimé dans le cancer du sein, du côlon de la prostate et de l'estomac et du récepteur ErbB4, surexprimé dans le cancer du sein et des cellules granuleuses de l'ovaire (25, 255, 317). Enfin, le récepteur ErbB2, également connu sous le nom de HER2, surexprimé dans le cancer du côlon, de l'œsophage, du poumon, du pancréas (25); (289, 373), mais surtout dans 30% des cancers du sein et de l'ovaire où il a été également possible de corréler le niveau de surexpression du récepteur à la malignité de la tumeur (317). Dans la plupart de ces exemples, c'est le mécanisme d'amplification génique qui est à l'origine de la surexpression du récepteur. Cependant,

la cellule cancéreuse peut maintenir persistante l'activité des récepteurs par d'autres mécanismes mutationnels. En particulier, différentes formes tronquées du récepteur de EGF ont été décrites, dont la variante III (EGFRvIII), qui est incapable de lier EGF à cause de la perte de la majorité de sa portion extracellulaire (174). Cette forme mutée du récepteur, détectée dans le cancer du sein et dans des tumeurs cérébrales du type des glioblastomes multiformes, est constitutivement active et permet le maintien des signaux de croissance vers le noyau. Outre les récepteurs de la famille EGFR, les intégrines représentent un autre exemple de protéines membranaires dérégulées pouvant induire une persistance anormale des signaux prolifératifs. Ce sont des molécules d'adhésion qui permettent les interactions cellule-matrice extracellulaire et cellule-cellule. Par le biais de ces interactions, elles permettent le maintien de l'intégrité du tissu et la survie de la cellule. Les intégrines vont participer au contrôle de différents aspects de la vie cellulaire, comme la différenciation, la migration, le maintien de la structure cellulaire, la survie et la prolifération. C'est le choix des partenaires avec lesquels les intégrines interagissent qui détermine quelle voie sera favorisée. Un changement dans le patron d'expression de ces protéines a été décrit lors de la transformation cellulaire, ce qui a permis de suggérer l'existence d'un lien entre l'expression des intégrines et le cancer (265). Le rôle des intégrines dans la transformation cellulaire est souvent associé au potentiel métastatique et migratoire des cellules cancéreuses. Cependant, pour certaines d'entre elles, comme pour l'intégrine $\alpha V\beta 5$, une altération du patron d'expression permet d'influencer directement la prolifération cellulaire (332, 366). Un changement dans l'expression des intégrines permettra à la cellule de modifier ses interactions avec l'environnement, favorisant ainsi tout contact aboutissant encore une fois au déclenchement d'un signal prolifératif (112, 213).

Des mutations ponctuelles peuvent également toucher différentes parties des récepteurs, comme c'est le cas pour le récepteur Met, récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGF). Des mutations situées dans le domaine kinase de ce récepteur ont été identifiées dans un type de cancer papillaire rénal, et engendrent une activité kinase constitutive (297, 165).

Un troisième niveau de contrôle se situe en aval des récepteurs membranaires, au niveau des voies intracellulaires de signalisation. L'interaction ligand-récepteur va déclencher le signal mitogénique à travers l'activation ou la répression des différentes composantes protéiques de la voie correspondante. Chacune des protéines activées ou réprimées va à son tour agir sur une autre protéine. Le résultat est une cascade complexe de modifications sur les différentes composantes du parcours de signalisation. Chacune des étapes de cette cascade influence l'étape successive. Il va de soit que n'importe quelle modification, à une seule étape de la cascade, aura des conséquences sur toute la voie de signalisation, mais également sur des voies différentes. En effet, il existe de nombreuses interactions entre les différents parcours de signalisation mitogénique (79), permettant la création d'un réseau d'interdépendance entre les différentes voies (89, 257) (figure 2). Par exemple, l'activation de la voie Grb2-Sos-Ras-Raf-Mek-Erk par l'interaction du facteur de croissance β PDGF avec son récepteur va également stimuler l'activation des voies de la phosphatidyl inositol kinase (PI3K), de JAK/STAT et peut également stimuler la voie de la protéine kinase C (PKC). La voie Sos-Ras-Raf-MAPK joue un rôle central dans la transformation cellulaire. Une expression inappropriée du gène *Ras* permettrait de stimuler la prolifération cellulaire en l'absence de signaux mitogéniques dans 25% des tumeurs (227). Il a été suggéré que les voies de signalisation

Figure 2: Exemple d'interaction entre différentes voies de signalisation mitogéniques



Tiré de: **Pawson, T., and T. M. Saxton. 1999. Signaling networks--do all roads lead to the same genes? Cell 97:675-8.**

mitogénique seraient affectées dans toutes les tumeurs humaines. D'autres composantes de ces voies, mis à part la protéine Ras, en seraient responsables (134).

Afin de s'affranchir de la signalisation dépendante des facteurs de croissance, la cellule va donc cibler les trois composantes principales de cette voie. Mais certaines cellules tumorales semblent adopter une quatrième stratégie. Rao et ses collègues ont démontré que la surexpression d'une protéine appelée HIP1 (Huntington Interacting Protein), impliquée dans le trafic vésiculaire par endocytose, pouvait favoriser la transformation cellulaire (272). En modifiant le trafic vésiculaire, HIP1 permettrait l'augmentation du nombre de récepteur au facteur de croissance épidermique EGFR à la membrane, avec comme résultat d'augmenter la signalisation mitogénique intracellulaire correspondante.

L'adoption par la cellule de ces différentes stratégies lui permet donc d'entrer dans une phase de prolifération active du cycle cellulaire.

2.3.2 Insensibilité aux signaux antiprolifératifs

Outre se rendre indépendante des signaux prolifératifs, la cellule tumorale va également s'affranchir des signaux antiprolifératifs. C'est au niveau du cycle cellulaire que se détermine l'arrêt de croissance. Suite à l'apparition de signaux anti-mitogéniques, la cellule peut adopter deux différents mécanismes pour arrêter de proliférer. Elle peut se désengager du cycle prolifératif actif en entrant en G0, phase durant laquelle la cellule reste métaboliquement active, mais ne se divise pas. La cellule peut également se différencier, ce qui mettra fin à sa prolifération (134). Plusieurs points de contrôle, lors du cycle cellulaire, permettent à la cellule de déterminer si toutes les conditions

optimales sont présentes afin qu'elle progresse à la phase successive. Lors de la phase G1, il existe un point de contrôle majeur appelé point R (restriction point) (254). Il s'agit d'un point de non-retour, considéré comme central dans le contrôle de la prolifération cellulaire, au-delà duquel la cellule devient insensible aux signaux pro- et anti-prolifératifs et s'engage donc inexorablement en phase S (214). La progression de la cellule d'une phase à l'autre du cycle cellulaire dépend de la présence d'un certain nombre de complexes protéiques, caractéristiques de chacune des phases du cycle. Ces complexes sont constitués d'une première sous-unité catalytique composée de sérine-thréonine kinases appelées CDK (Cyclin-Dependent Kinases). Les CDK ne sont fonctionnelles que si associées aux cyclines, qui constituent la deuxième composante régulatrice du complexe. Ces dernières ne sont pas toujours présentes, mais vont apparaître ou disparaître de façon cyclique. Elles seront synthétisées ou dégradées selon le besoin de la cellule. Les CDK seront donc activées ou désactivées en fonction de la présence ou non de leurs cyclines respectives. L'activité des CDKs est également contrôlée par des inhibiteurs de CDK (CKI), de même que par des phosphatases activatrices de la famille des Cdc25 ainsi que par des kinases activatrices appelées CAK (CDK Activating Kinases) (137, 243). L'objectif final de cette régulation fine est de contrôler la phosphorylation par les CDK des protéines cibles importantes dans l'avancement du cycle cellulaire. En particulier la protéine du rétinoblastome (pRb) joue un rôle central, puisqu'en contrôlant l'activité du facteur de transcription E2F, elle va permettre ou empêcher l'expression de gènes essentiels à la transition G1/S du cycle cellulaire. C'est donc au niveau de la régulation du cycle cellulaire qu'opèrent les signaux antiprolifératifs. La cytokine TGF β (Transforming Growth Factor beta) en est

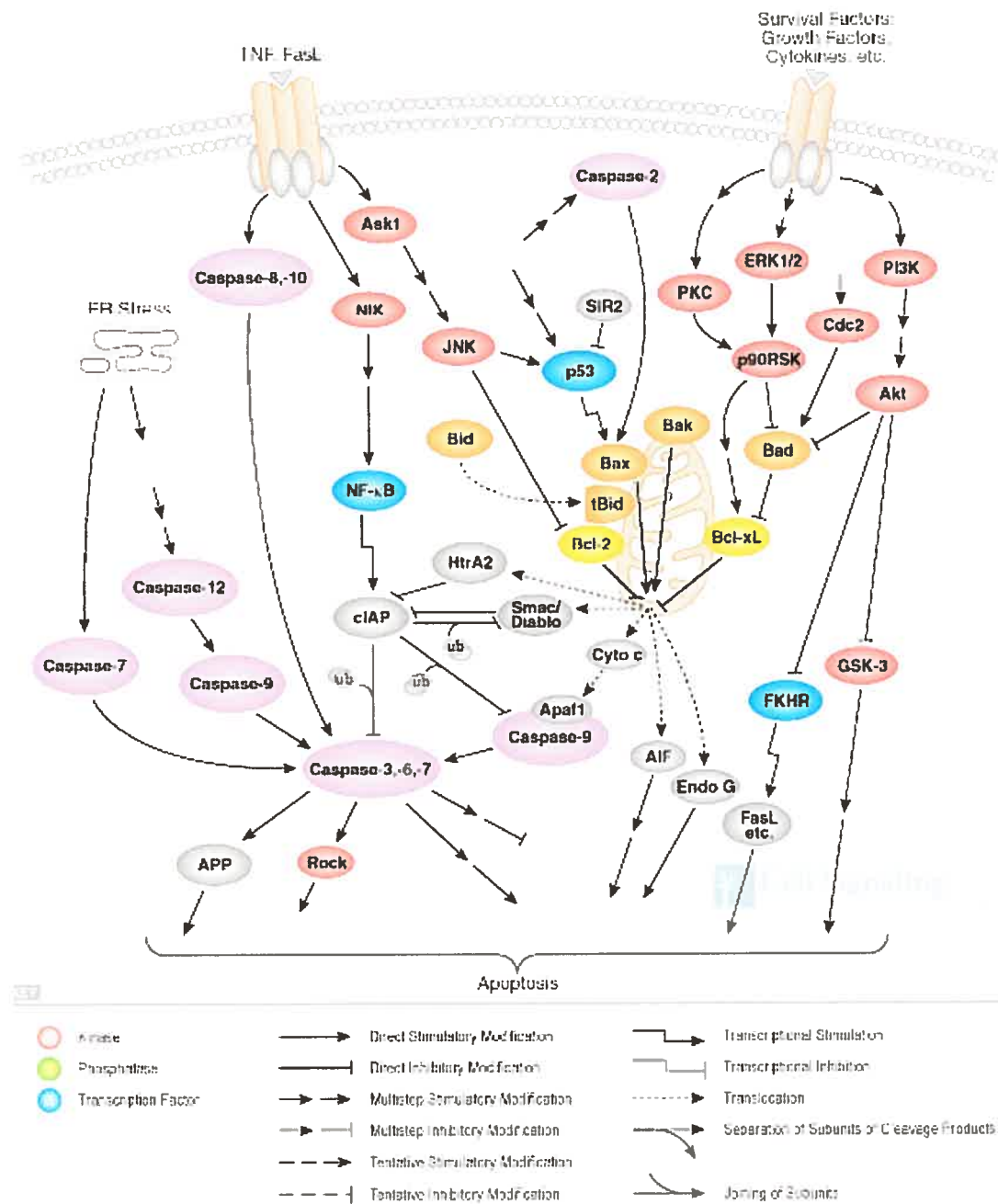
un exemple. TGF β joue un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation cellulaire. En modifiant l'activité des différents régulateurs du cycle cellulaire, par exemple en stimulant la production des inhibiteurs de CDK p15, p21 et p27, en inhibant la fonction ou la production des CDKs 2 et 4 et des cyclines A, D1 et E, TGF β arrête la progression cellulaire en G1 (194, 275). En effet tous ces changements auront comme conséquence l'accumulation de la protéine Rb sous sa forme phosphorylée, ce qui la rend incapable de relâcher le facteur de transcription E2F et par conséquent empêche la transcription de gènes importants pour la prolifération cellulaire. Plusieurs composantes de la voie de signalisation de TGF β seront donc ciblées lors de la progression tumorale, pour permettre à la cellule de s'affranchir des signaux antiprolifératifs. Il a été décrit que 100% des cancers pancréatiques de même que 83% des cancers du côlon possèdent des mutations à une étape de la voie de signalisation TGF β (119, 352). Une diminution ou une perte d'expression des récepteurs de TGF β de type I et II, de même que des protéines de signalisation smad2 et smad4, importantes lors de la transduction du signal de TGF β au noyau (24), une surexpression des cyclines D1 et E (222, 303) et des mutations dans le gène codant pour la protéine Rb (306) auront pour conséquence une résistance, de la part de la cellule, au signal antiprolifératif de TGF β . La cellule cancéreuse, affranchie des signaux de prolifération et d'inhibition de prolifération peut maintenant se diviser librement.

2.3.3 Résistance à l'apoptose

Contrôler la prolifération cellulaire ne répond pas seulement à un besoin de limiter le nombre des cellules qui composent un organisme. Il est également nécessaire de s'assurer que chaque cellule soit parfaitement apte à remplir sa fonction. Pour cette raison, lors de l'apparition d'un dommage pouvant compromettre son bon fonctionnement, la cellule subira un arrêt à l'un des points de contrôle du cycle cellulaire. Si le dommage est réparable, la cellule progressera le long du cycle cellulaire. Mais si les dommages sont trop importants, la cellule se suicidera par un mécanisme appelé apoptose (370). L'apoptose permet ainsi à l'organisme de se débarrasser des cellules défectueuses et empêche l'accumulation et la transmission de mutations néfastes pour l'intégrité cellulaire. Ce type de mort cellulaire, présente également lors de processus physiologiques normaux comme le développement, est caractérisé par une succession d'événements très précis conduisant à la mort de la cellule ciblée, en l'absence de tout phénomène d'inflammation. Elle présente des critères morphologiques bien définis comme la condensation de la chromatine à la membrane nucléaire, la fragmentation du noyau et du cytoplasme en structures que l'on appelle corps apoptotiques et la fragmentation de l'ADN (56). Toutes les composantes cellulaires seront éliminées par phagocytose, ce qui permet une suppression contrôlée de la cellule cible sans conséquences pour les cellules voisines.

Deux voies principales sont impliquées lors du déclenchement de l'apoptose (1) (figure 3). La première, extrinsèque, s'opère par le biais de récepteurs membranaires, que l'on appelle récepteurs de mort et qui, suite à l'activation par leur ligand, vont déclencher un signal conduisant la cellule à l'apoptose (10). On compte parmi ces

Figure 3: Mécanisme général de l'apoptose cellulaire



Tiré de: Cell Signaling TECHNOLOGY; <http://www.cellsignal.com>

récepteurs, ceux de la famille des TNFs (Tumor Necrosis Factors) incluant TNF-R1, CD95 et TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) -R1 et R2. La deuxième voie impliquée, que l'on appelle plutôt la voie intrinsèque, est activée suite à l'apparition d'un stress cellulaire comme un dommage à l'ADN ou l'absence de facteurs de croissance. C'est au niveau de la mitochondrie que sera prise en charge cette deuxième voie apoptotique (122). La machinerie intracellulaire responsable de l'accomplissement de l'apoptose est très complexe et plusieurs protéines y participent. En particulier, on retrouve les caspases, une famille de cystéine-protéases cytosoliques, qui sont présentes dans la cellule sous forme de zymogène inactif. Il existe deux classes principales de caspases, les initiatrices (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 et 14) et les effectrices (caspases 3, 6 et 7). Les premières sont capables former des dimères et de s'auto activer par clivage protéolytique. Elles vont à leur tour permettre l'activation des caspases effectrices ainsi que d'autres substrats, conduisant ainsi irréversiblement à la mort de la cellule. De façon générale, lors du déclenchement de l'apoptose par la voie extrinsèque, la liaison ligand-récepteur entraîne le recrutement à la membrane d'une procaspase activatrice, par exemple la procaspase 8 ou 10, par le biais d'une protéine adaptatrice appelée FADD (Fas-Associated Death Domain). S'ensuit la formation d'un complexe appelé DISC permettant l'activation de la caspase initiatrice. Le déclenchement de l'apoptose par voie intrinsèque se déroule différemment. Suite à l'apparition d'une situation de stress, la cellule subit des dommages à la mitochondrie, qui entraînent le relâchement d'un certain nombre de protéines dans le cytoplasme, entre autres, du cytochrome c. Le cytochrome c dans le cytoplasme lie la protéine Apafl (Apoptotic Protease Activating Factor), entraînant le recrutement de la procaspase 9. Ce nouveau complexe multiprotéique, appelé apoptosome, permet l'activation de la caspase initiatrice. Les caspases initiatrices

sont maintenant capables à leur tour d'activer les caspases effectrices 3, 6 et 7, qui seront à leur tour responsables des changements biochimiques et morphologiques caractéristiques de l'apoptose (1, 67). Il est évident que, compte tenu de l'importance que représente pour une cellule l'entrée en apoptose, il existe un grand nombre de protéines régulatrices, qui vont promouvoir ou entraver l'exécution du processus. Parmi les protéines plus importantes, on retrouve la famille des Bcl-2 (B Cell Lymphoma gene 2). Certains membres de la famille possèdent une activité pro-apoptotique (par exemple Bax, Bak, Bid, Bim), d'autres au contraire sont anti-apoptotiques (par exemple Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W). Ces protéines agissent principalement lors du déclenchement de la voie apoptotique mitochondriale et participent au relâchement du cytochrome c. On retrouve également la famille des protéines IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins), qui possèdent un domaine de liaison aux caspases et sont donc capables d'en inhiber la fonction (72), et beaucoup d'autres (146).

L'apoptose permet donc d'éliminer de l'organisme toute cellule ayant subi des changements très importants pouvant compromettre son activité normale. Or ces changements ont lieu lors de la transformation cellulaire. La résistance à l'apoptose devient donc une étape très importante dans le processus de transformation. De nombreuses altérations dans la fonction de protéines impliquées dans l'avènement de l'apoptose ont été décrites (162, 184). En particulier, une mutation dans la séquence de la protéine p53, une molécule clé dans le contrôle du déclenchement de la mort cellulaire programmée, est un des événements les plus fréquents dans les cancers humains (360). On pense que la protéine p53 est mutée dans 50% des tumeurs et que dans le restant des tumeurs, au moins une des composantes des voies de régulation de p53 sera affectée (58). La protéine p53, qui fait partie de la classe des suppresseurs de tumeurs, joue un

rôle important en tant que gardienne du génome. Une altération génétique responsable d'un dommage à l'ADN aura comme conséquence l'activation de p53, qui conduira soit à un arrêt du cycle cellulaire en G1 afin de permettre à la cellule de réparer le dommage, soit à la mort cellulaire par apoptose si le dommage en question est trop important (241). En situation normale, p53 agit en tant que facteur de transcription capable de lier des séquences d'ADN spécifiques présentes au niveau de promoteurs de gènes importants dans la progression du cycle cellulaire, par exemple, l'inhibiteur de CDK p21. La protéine p53 contrôle également la transcription de gènes jouant un rôle dans le processus d'apoptose, par exemple certains membres de la famille des Bcl2 comme Bax, les protéines Noxa et PUMA, ainsi que le récepteur Fas (230, 234, 235, 244).

La protéine p53 possède une durée de vie relativement courte et, suite à la liaison à la protéine Mdm2, elle sera dégradée par ubiquitination. Lorsque la cellule subit un stress comme la présence de radiations ionisantes ou de radiations UV, l'hypoxie, un choc thermique, l'insuffisance de facteurs de croissance, l'activation d'oncogènes ou la présence de drogues cytotoxiques, les niveaux de la protéine p53 vont s'accroître de façon significative dans la cellule (358, 360). Cette augmentation est due principalement à une plus grande stabilité de la protéine, suite à la phosphorylation de régions spécifiques en N-terminal de la protéine de même qu'à la déphosphorylation ou l'acétylation de sa région C-terminale. Une plus grande stabilité de la protéine se traduit par une augmentation de l'affinité de p53 aux sites de liaison à l'ADN, ce qui aura pour conséquence l'augmentation de la transcription des gènes cibles capables de déclencher le processus de mort cellulaire (288, 363). Le rôle de p53 comme facteur de transcription est donc fondamental afin de promouvoir l'apoptose. Il a été également démontré que p53 était capable d'induire l'apoptose par un mécanisme différent, indépendant de sa

capacité de contrôler l'expression génique. En effet, lors d'un dommage à l'ADN, la protéine peut se localiser à la mitochondrie et interagir directement avec des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-XL et contribuer ainsi à la cascade d'évènements conduisant à la mort cellulaire programmée (318). Lorsque la séquence du gène codant pour p53 est mutée, la cellule devient donc résistante à l'apoptose.

D'autres protéines jouant un rôle dans le contrôle de l'intégrité du génome peuvent interagir avec p53 et moduler son activité apoptotique. On peut penser par exemple à certaines composantes de la voie de signalisation ATM/ATR, comme CHK2, capable de phosphoryler la protéine p53 à la Ser-20, empêchant ainsi son interaction avec Mdm2. Ceci aura pour conséquence de stabiliser la protéine p53 et d'en augmenter son activité apoptotique (48). L'activité de p53 est par ailleurs influencée par un certain nombre de protéines régulatrices, par exemple p300/CBP (12) et E2F1 (153), toutes deux capables d'augmenter l'activité apoptotique de la protéine. En effet p300/CBP est capable de lier et d'acétyler la portion C terminale de p53 ce qui aurait pour effet d'en augmenter la stabilité et l'activité transcriptionnelle (63). E2F1 serait aussi capable de lier p53, mais également d'induire l'expression d'un certain nombre de cofacteurs nécessaires à l'activité pro-apoptotique de p53 (153, 147). Deux membres de la famille ASPP (Apoptotic-Stimulating Proteins of p53), ASPP1 et ASPP2 vont également, par interaction spécifique avec p53, en moduler l'activité apoptotique en promouvant la liaison de la protéine sur des régions promotrices du gène pro-apoptotique Bax, ce qui permettra d'en augmenter l'expression. (290). Outre la protéine elle-même, un grand nombre d'autres composantes pourront donc subir des mutations permettant de compromettre le déclenchement de l'apoptose p53-dépendante. C'est essentiellement la capacité de p53 de promouvoir l'apoptose qui constitue le point central de son activité

anti-tumorale. En effet, l'apoptose étant l'un des principaux mécanismes d'élimination de cellules comportant des altérations géniques, une mutation compromettant la fonction de p53 permettra la survie des cellules porteuses de mutations. Toute mutation permettant à la cellule d'acquies un avantage sélectif de prolifération contribuera de cette façon à la progression tumorale. Sans oublier la présence d'autres voies de signalisation capables d'influencer le processus d'apoptose, comme la voie du facteur de transcription NFkB (178), de même que la voie de la protéine kinase Akt/PI3K (47, 68), il est évident que p53, ne serait-ce que par le nombre de cancers où l'on retrouve la protéine mutée, représente un pivot central dans le contrôle de la progression tumorale. Altérer l'activité de p53 devient donc une étape essentielle pour la cellule dans son dessein d'échapper à l'apoptose.

2.3.4 Prolifération incontrôlée

Contrôler la prolifération cellulaire est donc essentiel pour l'organisme, afin de maintenir l'intégrité des tissus et des organes, mais également afin d'éviter l'accumulation et la transmission de mutations pouvant conduire au développement de tumeurs. Il existe un mécanisme intrinsèque à la cellule, appelé sénescence, qui permet de limiter le nombre de divisions que chaque cellule affrontera dans sa vie (141, 142). Initialement envisagé comme un mécanisme principalement impliqué au niveau du processus de vieillissement, plusieurs évidences suggèrent maintenant que la sénescence aurait évolué afin de répondre à un besoin de l'organisme d'empêcher toute cellule néoplasique de proliférer. En effet, une cellule normale peut entrer en sénescence, si mise en présence d'un stimulus potentiellement transformant, comme certains

dommages à l'ADN ou l'activation par mutation de l'oncogène *ras* (302, 42, 44). En effet, limiter le nombre de divisions d'une cellule permet de restreindre la quantité de mutations que cette dernière pourrait accumuler tout au long de sa vie. Le mécanisme de sénescence est donc également mis en œuvre lorsqu'une cellule normale est lourdement endommagée ou lorsqu'elle subit une agression pouvant conduire à l'apparition d'un phénotype transformé (183). Encore une fois, lorsqu'une cellule entame le processus de transformation, elle devra s'affranchir de ce mécanisme de contrôle afin de proliférer librement. L'immortalisation est d'ailleurs une des acquisitions que l'on retrouve dans un grand nombre des cellules transformées.

Une cellule en sénescence possède des caractéristiques bien définies, qui la distinguent d'une cellule en prolifération ou d'une cellule en apoptose. Morphologiquement plus grande et aplatie, riche en vacuoles cytoplasmiques, la cellule s'arrête en phase G1 du cycle cellulaire, mais elle reste métaboliquement active (77). La cellule augmente son activité beta-galactosidase à pH 6, ne répond plus aux signaux mitogéniques, devient partiellement résistante à l'apoptose (45, 361) et modifie le profil d'expression de nombreux gènes surtout impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. En particulier une surexpression des protéines p21 (240) et p16 (135), p53 (140), p14 (ARF) (76) ainsi que la présence prédominante de la protéine Rb sous sa forme hypophosphorylée caractérisent la cellule en sénescence (43).

Chez l'humain, on distingue aujourd'hui deux formes de sénescence, une première appelée sénescence intrinsèque ou répllicative télomères dépendante, et une deuxième appelée extrinsèque ou STASIS (Stress or Aberrant Signaling-Induced Senescence), télomères indépendante (159, 304).

C'est la longueur des télomères qui contrôle ce processus dans la première forme de sénescence. Les télomères constituent les extrémités des chromosomes, et sont composés de protéines associées à des séquences répétitives TTAGGG de 15-20 kilobases. Le complexe protéines-ADN forme un capuchon protecteur et prévient, d'une part la fusion, la recombinaison et la dégradation des extrémités des différents chromosomes, et d'autre part empêche la cellule de reconnaître ces dernières comme des cassures d'ADN (71). Mais puisque l'enzyme DNA polymérase est incapable de compléter la réplication du brin tardif, chaque chromosome présente en 3' une extrémité simple brin. À chaque nouveau cycle cellulaire, 50 à 150 bases ne seront donc pas dupliquées lors de la réplication (136). En effet, afin d'assurer une réplication fidèle des extrémités chromosomiques, la cellule nécessite une enzyme spécifique, la télomérase, qui n'est plus présente dans les cellules normalement différenciées. S'ensuit donc une perte progressive de matériel génétique. Après environ 60-70 cycles de réplication, la protection des extrémités ne sera plus assurée et la cellule déclenchera donc ses mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN, en particulier l'activation de p53.

Au plan moléculaire, ce sont les deux suppresseurs de tumeurs, p53 et Rb et leurs voies de signalisation respectives, qui interviennent principalement lors du déclenchement du processus de sénescence (44). La protéine p53, suite à l'activation transcriptionnelle de p21 va permettre l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (240). Successivement, un autre inhibiteur des CDK, p16 prendra la relève afin de maintenir l'arrêt de croissance (5). La cellule tumorale en voie de transformation échappe à ce premier niveau de contrôle, ce qui lui permettra de se diviser encore jusqu'à atteindre une deuxième étape appelée crise. Cette première phase est caractérisée par une grande

instabilité chromosomique, durant laquelle la cellule accumule nombre d'altérations génomiques importantes pouvant l'entraîner vers la mort cellulaire. En particulier, la cellule en voie de transformation ayant échappé au premier niveau de contrôle, présente, selon le type cellulaire, des mutations dans les gènes codant pour les protéines p53, Rb ou une perte d'expression de p16 (323). Afin d'échapper au deuxième niveau de contrôle représenté par la phase de crise, la cellule en transformation devra rétablir sa capacité de réplication des télomères, soit par l'expression de l'enzyme télomérase (59), ou par un mécanisme alternatif de recombinaison interchromosomale appelé ALT (35, 36). Presque toutes les tumeurs primaires ainsi que la plupart des lignées cellulaires tumorales expriment des hauts niveaux de l'enzyme télomérase (57). Elles présentent également des mutations dans différentes composantes des voies de signalisation de p21/p53 et p16/Rb. Les protéines p53 et Rb sont d'ailleurs la cible de protéines virales comme l'antigène grand T du virus de SV40 (305) ou les onco-protéines E6 et E7 du papillomavirus humain dans le processus d'immortalisation de la cellule hôte (27, 31). La cellule tumorale est maintenant immortelle et peut donc proliférer indéfiniment et acquérir de nouvelles mutations susceptibles de lui fournir un avantage sélectif.

Lorsqu'on parle de sénescence extrinsèque ou de STASIS, ce sont les mêmes voies de signalisation (p21/p53 et p16/Rb) et les mêmes mécanismes de contrôle qui opèrent lors de la sénescence intrinsèque qui sont impliqués, à l'exception des télomères. En effet, le signal déclenchant n'est plus la perte des extrémités chromosomiques, mais plutôt toute source de stress pouvant affecter l'intégrité cellulaire. Parmi ces facteurs de stress, on retrouve les radiations ionisantes et les radiations UV, le peroxyde d'oxygène, la surexpression de facteurs mitogéniques comme E2F1 ou l'expression de protéines mutées des oncogènes *ras* ou *raf* (159, 304).

Chez la souris, contrairement à l'humain, le nombre de divisions cellulaires autorisées pour chaque cellule n'est pas déterminé par la longueur des télomères. En effet, les cellules murines possèdent de plus longs télomères et maintiennent une activité télomérase tout au long de leur vie; elles entrent donc probablement en sénescence extrinsèque, suite à des dommages oxydatifs. Mais ce sont toujours les mêmes voies de signalisations que devra cibler la cellule en transformation afin de se rendre indépendante du phénomène de sénescence. L'immortalité représente donc une autre caractéristique des cellules tumorales leur permettant de s'affranchir du contrôle de prolifération cellulaire.

Si la sénescence représente un mécanisme de protection qui permet d'empêcher la prolifération de cellules cancéreuses, elle peut à long terme promouvoir la transformation cellulaire. Certaines évidences suggèrent que l'accumulation de cellules sénescents, en particulier de fibroblastes, favoriserait l'apparition de tumeurs (46). Dans ce contexte, la sénescence représenterait donc un exemple de pléiotropie antagoniste, théorie proposée par George C. Williams en 1957, et selon laquelle une caractéristique particulière favorisée par la sélection naturelle en bas âge, engendrerait des effets négatifs plus tard dans la vie. L'utilisation de co-cultures de fibroblastes sénescents et de cellules épithéliales peu ou totalement transformées, a permis de démontrer que les fibroblastes sénescents seraient capables d'induire la prolifération des cellules pré-tumorales et tumorales *in vitro* de même qu'*in vivo*, et ce par l'intermédiaire de facteurs diffusibles, ou non-diffusibles (191). La contiguïté de fibroblastes sénescents et de cellules épithéliales du sein induirait également l'invasion et la migration de ces dernières et en modifierait la différenciation. L'organisation morphologique de même que la fonction de l'épithélium mammaire seraient aussi affectés, suggérant que ce

mécanisme pourrait également être à la base du processus de vieillissement tissulaire normal (256).

2.3.5 Angiogenèse

La cellule tumorale s'étant affranchie des signaux mitogéniques et anti-prolifératifs, ayant acquis une résistance à l'apoptose et une capacité de prolifération infinie, est-elle capable à elle toute seule de générer une tumeur de taille significative et dont la présence représente un danger pour la vie de l'organisme qui l'abrite? De plus en plus d'évidences suggèrent que ce n'est pas le cas (134). Le développement d'une tumeur requiert la collaboration de cellules endothéliales capables de fournir à la masse tumorale un réseau de nouveaux vaisseaux sanguins, qui vont ainsi permettre un apport continu de nutriments et d'oxygène à toutes ces nouvelles cellules en prolifération active. Cette néo-vascularisation, appelé angiogenèse, est un mécanisme que l'on retrouve également lors du développement, ainsi que dans certains contextes particuliers comme à l'apparition d'une blessure ou lors du cycle menstruel chez la femme. Mais l'angiogenèse physiologique est finement régulée par la présence d'inhibiteurs et limitée dans le temps. Or, dans le cancer, l'angiogenèse persiste et accompagne la tumeur tout au long de sa croissance (97, 98, 377).

Plusieurs évidences, dans des modèles *in vitro* de structures tridimensionnelles comme les sphéroïdes, de même qu'*in vivo*, supportent l'hypothèse que la croissance d'une masse tumorale s'accompagne d'une néo-vascularisation abondante, et que celle-ci est nécessaire afin que la tumeur puisse atteindre une taille suffisante pour représenter une menace à l'intégrité de l'organisme (99, 113, 114, 133, 150, 315, 340). Cette néo-

vascularisation n'intervient nullement dans le processus de prolifération cellulaire, mais lorsqu'elle n'est pas présente, il arrive un moment où le nombre de cellules en apoptose ou en nécrose viendra balancer le nombre de cellules en prolifération, empêchant donc à la tumeur de grandir (344). La tumeur devra donc modifier son environnement afin de poursuivre son développement.

Une première évidence suggérant la production par la tumeur de facteurs diffusibles pouvant induire l'angiogenèse fut suivi par l'identification d'un grand nombre de protéines possédant une activité pro-angiogénique. Par exemple bFGF et aFGF (basic and acidic fibroblast growth factors) furent parmi les premières protéines connues, capables d'induire la prolifération de même que la migration des cellules endothéliales (100, 311). bFGF et aFGF sont habituellement produites par les cellules tumorales en prolifération, mais peuvent également être secrétées par des macrophages, que la tumeur recrute à cette fin (268). L'administration d'un anticorps spécifique contre bFGF dans un modèle de souris porteuse de tumeur réduit la production de nouveaux vaisseaux sanguins de même que le volume de la masse tumorale (182) démontrant que bFGF joue rôle *in vivo* dans l'angiogenèse. La protéine VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (95), ses homologues VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E (94, 189) et leurs récepteurs représentent un autre exemple important de facteurs jouant un rôle essentiel dans le processus de néo-vascularisation. Dans le cas de VEGF également, l'administration d'un anticorps anti-VEGF est capable, chez une souris porteuse de tumeur, d'en réduire la croissance d'un taux de 90% (182). L'anticorps n'avait aucun effet sur la croissance des cellules tumorales, démontrant la spécificité d'action de VEGF sur les cellules endothéliales (266). On sait maintenant que VEGF peut également agir sur les cellules tumorales. Plusieurs évidences démontrent la présence de récepteurs

de VEGF, surexprimés à la surface des cellules tumorales dans certains types de cancers par exemple dans certains carcinomes de poumons, des cancers du sein, d'ovaire, de pancréas, des mélanomes et des lymphomes non Hodgkin (69, 70); (160, 326). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une boucle autocrine, où VEGF en plus de stimuler la production de nouveaux vaisseaux sanguins, favoriserait en même temps la survie des cellules tumorales elles-mêmes (74, 223).

À ces facteurs pro-angiogéniques s'ajoute une longue liste, incluant TGF alpha et beta, l'angiopoietine-1 et bien d'autres (378). Parallèlement, nombreux inhibiteurs de prolifération des cellules endothéliales ont également été identifiés, suggérant qu'un changement dans la balance des niveaux d'expression des facteurs pro- et anti-angiogéniques pourrait être à la base du déclenchement du processus de néo-vascularisation (133). La cellule tumorale va donc induire la production de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à sa survie en stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales par le biais d'un changement d'expression de facteurs pro- et anti-angiogéniques. À leur tour, les cellules endothéliales synthétiseront différents facteurs mitogéniques, anti-apoptotiques et plusieurs protéases, qui leur permettront d'accéder à la tumeur, coopérant ainsi à son développement (90, 271). Certaines protéines membranaires, par exemple l'intégrine $\alpha V/\beta 3$, normalement peu exprimées dans les cellules endothéliales, seront également surexprimées lors de l'angiogenèse, favorisant ainsi la motilité de même que les propriétés protéolytiques de la cellule endothéliale (85, 301).

Plusieurs oncogènes connus semblent également participer à ce processus de néo-vascularisation, en modulant l'expression de protéines pro- et anti-angiogéniques. Par exemple, l'expression des protéines Bcl2 et HER-2 peut induire l'expression de

VEGF. De même, K-ras et H-ras vont induire l'expression de VEGF en même temps qu'ils inhibent la production de la thrombospondine-1, connue pour ses caractéristiques anti-angiogéniques (378). La cellule tumorale va donc modifier sa propre physiologie afin d'échapper aux mécanismes de contrôle mis en œuvre pour l'empêcher de proliférer librement, mais devra être également en mesure d'exploiter son environnement et de le façonner dans le dessein de survivre et de proliférer à l'intérieur de l'organisme.

2.3.6 Invasion des tissus et métastases

La néo-synthèse d'un système vasculaire n'a pas seulement comme objectif l'approvisionnement des cellules tumorales en nutriment et oxygène. En effet, un certain nombre de cellules transformées vont emprunter ce nouveau réseau afin de migrer et coloniser d'autres sites dans l'organisme. C'est dans ce contexte que se manifeste particulièrement l'aptitude des cellules tumorales à interagir avec leur environnement et à en modifier les caractéristiques.

La capacité d'invasion et l'apparition de métastases sont les aspects les plus mortels de la progression tumorale. En effet, 90% des patients atteints de cancer succomberont à la maladie suite à l'apparition de métastases (321). Lorsque la tumeur devient invasive, elle se répandra dans l'organisme, via les nouveaux vaisseaux sanguins dont elle a induit la formation. La dissémination tumorale peut se faire également par voie lymphatique, par laquelle la cellule cancéreuse atteindra les ganglions lymphatiques. À ce stade, le cancer est considéré comme étant généralisé. Récemment, certaines expériences effectuées dans des modèles murins, suggèrent que la cellule tumorale pourrait induire une lymphangiogenèse, au niveau de tumeurs solides, et ce par

le biais des facteurs spécifiques comme le VEGF-C et VEGF-D, capables de lier le récepteur VEGFR-3, exprimé par l'endothélium lymphatique. La création active, par les cellules tumorales, de nouveaux vaisseaux lymphatiques, en favoriserait la dissémination. Mais ces résultats restent à confirmer chez l'humain (261). Une fois entrée dans le système circulatoire, la cellule transformée devra extravaser et traverser les différents tissus conjonctifs qui séparent les organes afin de s'installer et de se multiplier à son nouveau site de destination (143, 367). L'invasion compromet la fonction des organes par compression locale alors que la métastase qui permet la dissémination de cellules cancéreuses tue son hôte car il devient impossible de cibler la tumeur par une quelconque thérapie anti-cancéreuse.

Tous les tissus que devra traverser la cellule tumorale sont autant de barrières établies par l'organisme afin de maintenir l'intégrité des organes qui le compose. Ce maintien de structure est principalement mis en œuvre grâce aux interactions spécifiques que la cellule peut établir avec les molécules présentes aussi bien sur la matrice extracellulaire que sur les cellules avoisinantes. C'est donc au niveau de ces interactions que doit agir la cellule tumorale lorsqu'elle entreprend le processus d'invasion et de migration (208). La possibilité d'envahir l'organisme dépend de la capacité de la cellule de mettre en œuvre deux mécanismes différents. Le premier aura pour objectif de favoriser le détachement des cellules afin d'en augmenter la motilité et d'altérer la structure tissulaire. Plusieurs protéines participent à cette première étape, par exemple les molécules d'adhésion cellulaire qui regroupent les intégrines, les protéines de la famille des immunoglobulines et les cadhérines.

Les intégrines permettent l'interaction physique entre les cellules et la matrice extracellulaire. Elles véhiculent la signalisation qui contrôle le remodelage du

cytosquelette cellulaire pris en charge par l'actine; elles influencent donc non seulement l'adhésion des cellules mais également la motilité cellulaire (157). La signalisation intracellulaire dépendante des intégrines emprunte la voie des Ras-Raf-MAPK-ERK, et agit également sur la prolifération et la survie de la cellule, recouvrant donc un rôle qui dépasse la seule motilité cellulaire (255, 331). L'expression du récepteur de la vitronectine, l'intégrine $\alpha V\beta 3$ est un exemple de marqueur moléculaire permettant d'identifier un changement dans le comportement de la croissance cellulaire caractéristique de l'apparition de métastases dans les mélanomes (26).

Dans la famille des immunoglobulines, les protéines d'adhésion intercellulaires CAMs représentent un autre exemple de molécules jouant un rôle dans le processus d'invasion et de migration. En plus d'interagir entre elles et de permettre le maintien d'une structure organisée des tissus, les CAMs deviennent des récepteurs d'intégrines de même que pour nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance et des kinases (172) permettant ainsi la transduction d'un signal de la surface à l'intérieur de la cellule. Un changement d'expression de certaines CAMs, par exemple une surexpression de MCAM, corrèle avec l'apparition de métastases de mélanomes chez l'humain comme chez la souris (26) alors qu'une perte d'expression de MCAM est fréquemment observée dans des carcinomes de sein (310).

Les cadhérines, composantes essentielles des jonctions adhérentes, interagissent entre elles par le biais de leur portion extracellulaire, et permettent la communication entre cellules voisines (129, 206). Elles jouent un rôle primordial dans le maintien du cytosquelette d'actine par le biais de leur interaction aux beta-caténines. Elles sont impliquées dans le processus de métastase dans différents types de cancers. En particulier, les E-cadhérines, caractéristiques des cellules épithéliales, peuvent agir en

tant que suppresseurs de tumeurs et influencer le potentiel invasif de la tumeur. Par exemple, une perte d'expression des E-cadhérines corrèle avec une capacité accrue d'invasion et l'apparition de métastases dans la progression du cancer épithélial de l'ovaire (149). En revanche, une augmentation d'expression des N-cadhérines, augmente la motilité cellulaire dans différents types cellulaires. Il a d'ailleurs été proposé que l'expression de la forme migratoire mésenchymale N-cadhérine plutôt que la forme épithéliale E-cadhérine pourrait favoriser l'invasion et la formation de métastases (206, 207).

Enfin la beta-caténine représente une molécule-clé dans différents processus de transformation. Partie intégrante des jonctions adhérentes, elle est normalement séquestrée par l'E-cadhérine et participe donc au processus d'adhésion intercellulaire. La balance entre beta-caténine libre dans le cytoplasme et séquestrée à la membrane est déterminante lors de la transformation cellulaire en particulier dans le cancer du côlon. Lorsque la beta-caténine libre s'accumule dans le cytoplasme, elle migrera au noyau et se liera aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF-1, qui à leur tour contrôlent l'expression de gènes importants dans la prolifération cellulaire et la migration, comme c-Myc, la cycline D1, la fibronectine et la matrilysine (64, 206, 258). Toute modification des niveaux de la protéine beta-caténine libre engendre donc une modification dans l'adhésion des cellules de même qu'une altération de l'expression génique favorisant ainsi la progression tumorale (26).

La deuxième étape importante lors de l'invasion tumorale est la dégradation de la matrice extracellulaire par protéolyse. La cellule tumorale de même que les cellules stromales participent à cette cascade d'événements enzymatiques en induisant l'expression d'un certain nombre de protéases et en diminuant l'expression de leurs

inhibiteurs correspondants. Les principaux enzymes lytiques qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire sont les MMPs (Matrix Metalloproteinases), les protéases sérine-spécifiques telles que l'uPA (urokinase Plasminogen Activator), la thrombine et la plasmine, les ADAMs (Adamalysin-related membrane proteases), BMP-1 (Bone Morphogenetic Protein metalloproteinase), l'héparanase et les cathepsines (208). Chacune de ces protéines participe à la dégradation d'une composante de la matrice extracellulaire, permettant donc d'altérer la structure tissulaire et par la même occasion de libérer certains facteurs favorisant la migration cellulaire ou l'angiogenèse. Par exemple certains facteurs de croissance comme bFGF et VEGF, des chemokines et des CAMs, seront libérés lors de la dégradation de la matrice extracellulaire par l'héparanase (356, 354, 355). Parmi les plus importantes protéinases associées au phénomène métastatique, l'on retrouve les MMPs. Dans de nombreux cancers comme le cancer des ovaires, du poumon, de la prostate, du sein et du pancréas, il a été possible de démontrer une corrélation entre l'activité des MMPs et le potentiel invasif et métastatique des tumeurs (62, 209, 211). L'activité des MMPs est contrôlée par la présence d'inhibiteurs spécifiques, les TIMPs, sécrétées par la cellule tumorale elle-même et le débalancement entre les niveaux de MMPs et de TIMPs est essentiel au déclenchement du processus invasif. La modulation de l'expression des TIMPs est donc une étape cruciale à l'acquisition du caractère invasif des cellules tumorales (52, 82).

L'interaction entre la cellule tumorale et son environnement est primordiale afin de permettre le processus d'invasion. Il l'est d'autant plus lors de l'établissement des cellules métastatiques à leur destination finale. En effet, le site d'implantation des métastases dépend pour la plupart du temps de la localisation de la tumeur primaire. Déjà en 1889, Paget émet l'hypothèse qu'il existait pour chaque cellule tumorale, un

environnement idéal et privilégié, qui offrirait à la tumeur les conditions nécessaires et optimales à sa croissance (380). On sait depuis que chaque différent type de tumeur primaire va privilégier un site de colonisation spécifique. Par exemple, les métastases du cancer du sein s'établissent essentiellement aux os, au poumon et au foie, les métastases du cancer du poumon et du cancer de la peau privilégient surtout le cerveau et les métastases du cancer de la prostate colonisent les os (221). Différents mécanismes ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène et tous convergent vers une coopération active et intense de la cellule tumorale avec son environnement (367). Qu'il s'agisse de la matrice extracellulaire, des cellules endothéliales, du système immunitaire, ou d'autres organes avec lesquels elle entre en contact, la cellule tumorale dépend de son environnement et se doit donc de le modifier à son avantage afin de progresser de manière efficace vers un phénotype plus agressif.

La cellule devra donc franchir avec succès plusieurs étapes lors de sa progression tumorale. Chaque modification génétique ou épigénétique devra fournir à la cellule un avantage sélectif lui permettant de mieux proliférer et de résister aux différents mécanismes de contrôle et de défense mis en œuvre par l'organisme qui l'abrite. Une coopération active avec l'environnement est également fondamentale à la progression tumorale. Le nombre et le type de modifications nécessaires à la transformation, vont varier d'une cellule à l'autre, mais les mécanismes empruntés et les événements ciblés seront les mêmes. L'ordre d'acquisition des différents traits qui caractérisent la cellule tumorale peut également différer d'une tumeur à l'autre (134). Il a été par exemple suggéré que les modifications nécessaires à l'apparition de métastases, un processus normalement associé à une phase tardive de la maladie, pourraient en réalité subvenir

relativement tôt lors de la progression tumorale. L'avantage que ces modifications confèrent à la cellule se manifesterait seulement dans un contexte favorable, en temps et lieux qui lui sont dus (19). Étant donnée la complexité de la maladie et le nombre croissant de paramètres impliqués, entre autres, l'influence considérable de l'environnement cellulaire, la disponibilité de systèmes modèles capables de contrôler certains paramètres et par conséquent de mieux disséquer chacune des étapes qui conduisent de la cellule normale à la cellule transformée représente un outil indispensable à une meilleure compréhension du processus de progression tumorale. Ces systèmes modèles permettent, entre autres, d'isoler certains événements importants lors de la transformation cellulaire.

3.0 Systèmes modèles de progression tumorale: le modèle de souris

La souris utilisée en tant que modèle d'étude *in vivo* de maladies humaines comme le cancer s'est révélé un outil très profitable aux chercheurs. Nombreux avantages sont associés à l'utilisation de ce modèle. Avant tout, l'homme et la souris partagent plusieurs similitudes quant à leur structure génétique et au développement tumoral. De plus, chez la souris, la tumeur se développe dans l'intervalle de quelques mois plutôt que sur des années, permettant donc d'en accélérer l'étude. La possibilité de contrôler l'environnement dans lequel vivent les animaux permet de maintenir identiques, dans le temps et pour chacun des animaux, certains paramètres expérimentaux. La disponibilité de souches consanguines possédant le même génotype permet également aux chercheurs de répéter chacune des expériences sur différents individus possédant la même structure génétique et qui par conséquent devraient

répondre de façon identique au protocole expérimental, facilitant de cette façon la validation des résultats. Ainsi, il est possible d'étudier les interactions entre l'environnement, par exemple une substance chimique potentiellement cancérigène, dans un milieu contrôlé, associé à une base génétique spécifique. Enfin, la possibilité, surtout grâce à l'avancement technologique, de modifier le génome de la souris permet de disséquer de façon toujours plus précise la maladie du cancer. En effet, l'introduction d'un oncogène par la technique des souris transgéniques, de même que l'élimination d'un gène suppresseur de tumeur par la technique des souris ayant une ablation génétique (knock-out) permet de suivre de façon plus précise, le rôle que chacune de ces altérations génétiques joue dans l'apparition et la progression tumorales. Les premiers modèles de souris transgéniques surexprimant des oncogènes viraux ou cellulaires (2, 32, 132, 327), de même que l'inactivation ciblée dans les cellules embryonnaires souches de gènes suppresseurs de tumeurs (78, 163), ont représenté le début d'une nouvelle ère dans l'étude du cancer. La création d'un grand nombre de souris, chacune porteuse d'une altération génétique différente permet également, par le croisement de certaines d'entre elles, d'étudier la coopérativité des différentes lésions génétiques dans la progression tumorale (217). Par exemple, lorsque l'on croisait des souris porteuses de l'oncogène *v-ras* sous le promoteur MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) avec des souris porteuses de l'oncogène *c-myc* sous le même promoteur, l'apparition de carcinomes mammaires chez la souris dérivée était grandement augmentée, démontrant ainsi une coopérativité des deux gènes dans la transformation *in vivo* (313). De manière semblable, *bcl-2*, en promouvant la survie des cellules B en prolifération, collabore à l'apparition de lymphomes chez la souris transgénique porteuse de *c-myc* (329, 349). Les altérations génétiques générées sont transmissibles d'une génération à l'autre,

fournissant ainsi un réservoir illimité de spécimens identiques. Plus récemment, la possibilité de cibler l'expression ou l'inactivation des gènes en étude, dans l'espace et dans le temps, a permis au modèle de souris de représenter de manière encore plus fidèle, la réalité de la maladie (130, 164, 205). En effet, dans certains cas, l'expression d'oncogènes chez la souris transgénique, de même que la disparition de gènes suppresseurs de tumeurs chez la souris porteuse d'ablation génétique, peuvent s'avérer létales au stade embryonnaire, empêchant donc l'étude de la contribution de certains gènes à la transformation néoplasique. De plus, l'expression généralisée dans tous les tissus de l'organisme, ne reflète pas toujours la réalité de la maladie. En effet, le cancer est habituellement caractérisé par l'apparition de mutations sporadiques dans le génome d'une cellule, ciblant certains tissus spécifiques. Par conséquent, l'utilisation de techniques permettant de générer des mutations tissu- spécifiques, et dont l'expression peut être contrôlée dans le temps, permet de reproduire de façon plus fidèle l'apparition et la progression du cancer. Cibler l'expression du transgène dans un tissu est très important pour l'étude de la transformation cellulaire puisqu'il existe une spécificité tissulaire dans l'action des différents oncogènes (2). Quelques transgènes, bien qu'exprimés dans plusieurs tissus, n'auront de potentiel oncogénique que dans certains d'entre eux. C'est le cas par exemple des souris transgéniques porteuses de la séquence codante pour le facteur de transcription *c-fos*, qui ne développent des tumeurs qu'au niveau des os et des cartilages (287). De manière semblable, les souris transgéniques porteuses de la séquence codante pour le facteur de transcription *v-jun* (299) ne développent des tumeurs qu'au niveau du derme alors que, dans le cas de *c-fos* comme dans les cas de *v-jun*, le transgène s'exprime dans plusieurs tissus de l'organisme.

3.1 Souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome

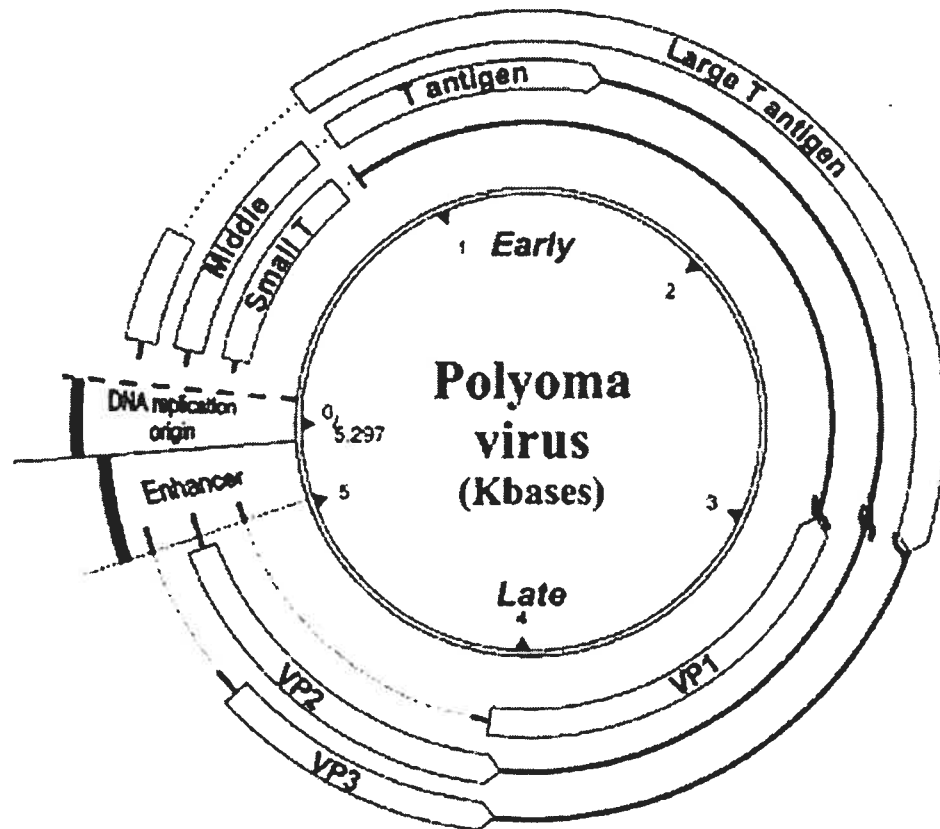
L'introduction d'altérations génétiques chez la souris permet donc l'étude de la contribution de certains gènes dans le processus de tumorigénèse. Or, comme il a été mentionné précédemment, l'apparition d'une tumeur découle d'une progression d'évènements, chacun capable de contribuer à l'acquisition des différents traits caractéristiques de la cellule transformée. Grâce au modèle de souris transgéniques, il a donc été possible d'identifier certains évènements nécessaires à la progression tumorale, par l'expression de gènes capables de participer au processus de transformation sans pour autant posséder des caractéristiques transformantes. C'est le cas par exemple des souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome.

3.1.1 Le virus de polyome

Le virus murin de polyome (Py) appartient à la famille des papovaviridae. Découvert en 1953 par Ludwig Gross (127), et nommé en conséquence de sa capacité à générer un grand nombre de différentes tumeurs chez la souris nouveau-née, il est constitué d'un génome circulaire à double brin d'ADN de 5300 paires de bases (figure 4). Douze membres composent le genre des polyomavirus, incluant le plus notoire d'entre eux, le virus simien SV40 (Simian Vacuolating Virus 40) découvert en 1960 par Sweet et Hilleman (335). Deux membres de la famille, capables d'infecter l'humain, les virus BKPyV et JCPyV, ont également été identifiés.

Les virus de la famille des papovavirus peuvent infecter un nombre restreint d'organismes hôtes. L'infection déclenche le cycle lytique permettant la production d'un

Figure 4: Génome du virus de polyome



Tiré de: **Natalia Ichaso and Stephen M Dilworth. 2001. Cell transformation by the middle T-antigen of polyoma virus. Oncogene 20:7908-7916**

grand nombre de particules virales. S'ensuit la mort de la cellule infectée et les nouvelles particules virales vont s'attaquer à d'autres cellules de l'organisme perpétrant ainsi la multiplication virale. Lorsque le virus infecte une cellule non permissive, il n'y a pas production de nouvelles particules virales. L'ADN du virus peut alors s'intégrer au génome de l'hôte, et l'infection conduit dans certains cas à la transformation de la cellule. Le génome circulaire du virus de polyome est divisé en trois régions fonctionnelles distinctes. La première région, dite régulatrice (RR), contient l'origine de réplication du virus de même que les régions promotrices et régulatrices. Suit la région précoce, qui code pour les antigènes T, ou antigènes de tumeurs, ainsi nommés parce que initialement identifiés dans des cellules de tumeurs infectées par le virus. Chez le virus murin du polyome, quatre de ces protéines ont été décrites, l'antigène grand T (LT-Ag), l'antigène moyen T (MT-Ag), l'antigène petit T (ST-Ag) et successivement l'antigène minuscule T (T-Ag) (279). Ils partagent la même séquence N-terminale, mais diffèrent dans leur portion C-terminale, résultat de l'épissage alternatif d'un messenger d'ARN commun (320). Enfin la région tardive code pour les protéines de la capsid VP1, VP2 et VP3.

L'antigène moyen T du virus de polyome murin est le principal responsable de la transformation cellulaire des cellules infectées (342). La protéine se localise à la membrane plasmique (75) et agit de manière semblable à un récepteur de facteur de croissance de la famille des tyrosines kinases (158). MT-Ag interagit avec un grand nombre de partenaires cellulaires, entre autres, la protéine phosphatase 2A (PP2A) en collaboration avec ST-Ag (251), et différents membres de la famille des tyrosine-kinases c-Src (54, 61, 188, 193). L'interaction de ces kinases avec l'antigène moyen T induit la phosphorylation de tyrosines sur MT-Ag et permet la liaison de domaines SH2 de

plusieurs protéines, comme la protéine phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) (60), la phospholipase C gamma (248) et la protéine adaptatrice Shc (Src Homology 2 and Collagen (a1) related) (23, 41). S'ensuit l'activation de p21 (ras) et de la voie de signalisation des MAP kinases (9, 296). D'autres protéines participent à l'activité transformante de MT-Ag, par exemple la chaperonne Hsp70 (250), et des membres de la famille des protéines 14-3-3 (249). La liaison de MT-Ag aux protéines de la famille Src représente une étape essentielle au processus de transformation (117), et toute interférence empêchant l'avènement des interactions qui s'ensuivent abolit la transformation cellulaire dépendante de MT-Ag. Chacun des partenaires de MT-Ag joue un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire, et c'est en interférant avec ces facteurs et en modifiant le statut de phosphorylation de certains d'entre eux, que MT-Ag altère donc la régulation normale du cycle cellulaire.

L'antigène grand T du virus de polyome initie et régule la transcription et la réplication du génome viral et, en l'absence d'autres antigènes viraux, induit la réplication de l'ADN cellulaire (102, 116). LT-Ag est également capable d'immortaliser des cultures primaires de fibroblastes (274). Dans ce dessein, LT-Ag lie la protéine Rb, libère le facteur de transcription E2F et perturbe ainsi la régulation du cycle cellulaire (105, 181, 278). L'immortalisation des cellules *in vitro* par l'antigène grand T du virus de polyome est dépendante de sa capacité à lier la protéine Rb. En effet, l'expression de mutants de LT-Ag, incapables d'interagir avec Rb n'induit plus l'immortalisation cellulaire (197, 198, 263). LT-Ag possède également en sa région C-terminale un domaine DNA J, homologue à la famille des chaperonnes J (322), capable de stimuler l'activité ATPase des protéines Hsp70, impliquées dans l'interaction et l'agrégation protéiques (33, 66). L'antigène grand T du virus de polyome peut également lier le co-

activateur transcriptionnel p300/CBP, ce qui pourrait l'empêcher de lier le facteur de transcription CREB et modifier son activité transcriptionnelle (55, 236). Enfin, LT-Ag pourrait moduler la réponse cellulaire à l'apoptose, par exemple en interférant avec le recrutement ou l'activation de la caspase 8 suite à l'induction d'un signal apoptotique FasR dépendant (199, 280). Mais à l'opposé de l'antigène grand T de SV40, cette activité anti-apoptotique semble être p53 indépendante (118).

Le potentiel oncogénique du virus de polyome dépend donc principalement de l'activité de MT-Ag puisque l'expression de l'antigène grand T immortalise mais ne transforme pas les cellules primaires en culture (274). À son tour, MT-Ag ne permet pas aux cellules primaires de s'affranchir du processus de sénescence, mais peut induire la transformation cellulaire sans la présence de LT-Ag (342). Afin de disséquer *in vivo* la contribution de chaque antigène à l'avènement d'une tumeur, en particulier la participation du processus d'immortalisation par l'antigène grand T comme point de départ de la transformation cellulaire, plusieurs souris transgéniques ont été générées.

3.1.2 Les souris transgéniques porteuses de LT-Ag

Plusieurs souris transgéniques, porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome sous le contrôle de différents promoteurs ont été décrites, chacune caractérisée par un phénotype spécifique. Chez certaines d'entre elles, par exemple lorsque LT-Ag fut exprimé sous le promoteur alpha A-cristalline, l'expression du transgène dans la lentille des yeux provoquait chez l'embryon un dérangement dans la différenciation des cellules de l'œil, ayant pour conséquence la perturbation du développement normal de la lentille oculaire. Les souris naissantes étaient aveugles, et les cellules allongées de l'œil,

morphologiquement anormales, ne possédaient plus de noyau. Aucune hyperplasie ni aucune forme tumorale ne fut observée. Les mêmes cellules, lorsque mises en culture, avaient une capacité proliférative augmentée. Le facteur de croissance bFGF, additionné au milieu de culture de ces cellules, pouvait en inhiber la prolifération, soulignant l'importance du rôle de l'environnement dans la tumorigénèse *in vivo* (125, 126). Un défaut de développement fut également observé chez des souris exprimant l'antigène grand T sous le contrôle de son promoteur viral, au niveau du système nerveux central. Aucune tumeur ne fut observée, mais un défaut dans la maturation des oligodendrocytes responsables de la myélinisation axonale avait comme conséquence la démyélinisation de la matière blanche du cerveau, du cervelet, de la moelle épinière et des nerfs périphériques, causant ainsi l'apparition d'un désordre neurologique chez l'animal (15, 168).

Il fut également possible d'observer l'apparition d'hyperplasies chez des souris porteuses de l'antigène grand T sous le promoteur de la métallothionéine. L'expression du transgène dans le cœur des animaux entraînait l'apparition d'une population cellulaire hétérogène de cardiomyocytes, composée de cellules anormalement agrandies et de cellules relativement normales ayant pour conséquence la formation d'hyperplasies cardiaques causant la mort de l'animal (50).

Enfin, plusieurs lignées transgéniques ont mené à l'apparition de tumeurs chez l'animal. Par exemple, des souris âgées de plus d'un an, porteuses de LT-Ag sous le contrôle du promoteur de l'insuline, ont développé des tumeurs des cellules beta du pancréas (16). L'antigène grand T sous le promoteur de la métallothionéine, lorsque exprimé dans les testicules, occasionnait chez le mâle âgé de huit à douze mois, l'apparition d'adénomes testiculaires (51). De manière analogue, lorsque l'antigène

grand T fut exprimé sous le contrôle des séquences régulatrices du virus de polyome, l'expression du transgène dans les tubules séminifères engendra l'apparition, chez certains mâles âgés, de tumeurs testiculaires (252). Enfin, l'expression de LT-Ag sous le contrôle du promoteur de la kératine 19 a causé l'apparition, neuf à douze mois après la naissance, d'adénocarcinomes pulmonaires (202).

L'expression de l'antigène grand T du virus de polyome semblait donc être à l'origine du phénomène de tumorigénèse dans différents modèles de souris transgéniques. Cependant, un délai de plusieurs mois était toujours requis à l'apparition des lésions néoplasiques. Bien que LT-Ag fût exprimé depuis la naissance, les tumeurs n'apparaissaient que tard dans la vie des souris transgéniques; cette latence suggérait que d'autres événements étaient également nécessaires pour compléter le processus de transformation. Ces souris apparaissaient donc être un modèle idéal afin d'étudier ces événements, qui représentent les différentes étapes de la progression tumorale.

3.1.3 Les souris transgéniques MT-PVLT-10 utilisées comme modèle d'étude du processus de progression tumorale

Comme il a été mentionné précédemment, un des avantages que présente l'utilisation des souris transgéniques est l'homogénéité de leur structure génétique. Ainsi, si l'on compare le profil d'expression génique de tissus normaux versus néoplasiques, issus d'une même souche de souris transgénique, il est possible d'identifier tout changement occasionné entre les deux types de tissus. Il est donc envisageable d'isoler des événements impliqués dans le processus de transformation cellulaire. Il est par ailleurs essentiel de s'assurer que toute modification dans

l'expression génique est spécifique à la progression tumorale, et ne dépend pas de facteurs indépendants du processus de transformation. En effet, l'apparition de tumeurs peut générer des changements physiologiques chez la souris, par exemple le recrutement de cellules du système immunitaire qui pourraient modifier le profil d'expression des tissus analysés. De plus, les prélèvements de tissu tumoral sont souvent contaminés par la présence de tissu normal avoisinant. Établir des lignées cellulaires homogènes, dérivées des tissus normaux et tumoraux de souris transgéniques représente donc une solution à ces problèmes. Deux lignées cellulaires ont été établies, à partir de souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome sous le promoteur de la métallothionéine (MT-PVLT-10) (200). Le phénotype de ces souris présentait trois phases principales. Lors de la phase 1, de la naissance à six mois de vie, les souris étaient parfaitement normales. En phase 2 (six à 10 mois), les souris mâles développaient des hyperplasies au niveau des vésicules séminales, mais ne présentaient aucune tumeur testiculaire. Enfin, en phase 3 (au-delà de huit mois de vie), l'hyperplasie des vésicules séminales s'accompagnait de la présence d'adénomes testiculaires. La première lignée établie en culture, appelée D37, dérivait de testicules normaux prélevés chez un mâle en phase 2. Il fut impossible d'établir une lignée à partir de jeunes individus dépourvus de tout phénotype car les cellules mises en culture entraient rapidement dans une phase de crise qui conduisait à la mort cellulaire. Les cellules D37 injectées dans des souris nues étaient incapables de promouvoir la formation de tumeurs. La deuxième lignée, appelée D4, dérivait de testicules adénomateux prélevés chez un mâle en phase 3. L'injection des cellules D4 dans des souris nues causait, trois à sept semaines plus tard, l'apparition de tumeurs. Les lignées cellulaires D37 et D4 furent ensuite caractérisées. Toutes deux exprimaient l'antigène grand T du virus de polyome

de même que des marqueurs cellulaires de cellules Leydig et Sertoli. La présence contemporaine des cellules de type Leydig et Sertoli, était essentielle à l'activité transformante de la lignée D4 lors de l'injection des cellules dans des souris nues. Les lignées cellulaires D37 et D4 ainsi établies représentaient donc un outil important permettant de révéler des différences dans le profil d'expression génique, avant et après l'apparition des tumeurs testiculaires chez les souris MT-PVLT-10. Par la technique de l'étalement de produits de PCR sur gel de polyacrylamide (Differential Display), effectué sur l'ARN messager des lignées D37 et D4, il fut possible d'identifier plusieurs gènes différentiellement exprimés lors du passage du phénotype pré-néoplasique au phénotype néoplasique (199, 201). Une nouvelle séquence nucléotidique en particulier, baptisée *TDE1* (testicular Tumor Differentially Expressed gene) était exprimée deux à quinze fois plus abondamment dans les lignées cellulaires testiculaires dérivées de tumeurs testiculaires que dans les tissus correspondants. *TDE1* ne présentait aucune homologie avec des gènes déjà décrits et sa fonction n'était donc pas connue. L'analyse de la séquence protéique révélait la présence de plusieurs domaines hydrophobiques de type alpha-hélice, suggérant que le produit du gène *TDE1* pourrait se localiser à la membrane cellulaire.

Puisque la surexpression représente l'un des mécanismes par lesquels certains gènes contribuent au processus de transformation, *TDE1* devenait un bon candidat dans l'identification des événements responsables de la progression néoplasique chez les souris MT-PVLT-10.

4.0 La famille de protéines TDE1/TMS

TDE1 a été le premier membre de la famille des protéines TDE1/TMS à être isolé et décrit chez la souris (201). Nous avons ensuite identifié et initié la caractérisation de l'homologue humain de *TDE1*, afin de déterminer si la protéine pouvait jouer un rôle dans la transformation cellulaire. Le premier groupe à suggérer l'existence d'une nouvelle famille de protéines homologues à *TDE1* a été celui de Krueger en 1997 (192). L'objectif principal de l'étude était d'identifier des nouveaux gènes impliqués dans le processus de différenciation des prooligodendroblastes en oligodendrocytes postmitotiques. Cette transition s'accompagne d'une myélinogénèse des axones. Krueger a identifié un nouveau cDNA chez le rat, homologue à *TDE1*, qu'il a appelé *TPO1* et qui pourrait jouer un rôle dans le développement des oligodendrocytes et dans la synthèse de myéline. En 2003, Xu et al. ont identifié l'homologue humain de *TPO1*, qu'ils ont appelé *C5orf12* (371). Le groupe de Grossman en 2000 était à la recherche de nouvelles séquences pouvant coder pour des protéines hydrophobiques qui se localiseraient dans des régions du cerveau riches en neurones glutamatergiques (128). Leur objectif était en effet d'identifier des nouveaux transporteurs du neurotransmetteur glutamate. Le groupe a de cette façon identifié chez la souris deux nouveaux membres de la famille, *TMS-1* et *TMS-2*. L'analyse de séquence a mis en évidence que *TMS-1* et *TDE1* correspondaient au même gène. *TMS-2* représentait un nouveau membre de la famille, et semblait s'exprimer spécifiquement dans le système nerveux central. Ils ont également cloné un membre de la famille chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et identifié des homologues chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et chez la mouche

a été identifié une troisième fois par Aoki et al. en 2002 (8). Dans une étude précédente, le même groupe avait démontré qu'un certain nombre de protéines impliquées dans la régénération neuronale suite à l'axotomie des nerfs du système nerveux étaient glycosylées. Ils ont donc développé une nouvelle méthode leur permettant d'isoler spécifiquement des protéines glycosylées, et dont le patron d'expression variait en réponse à l'axotomie. Ils ont ainsi identifié chez la souris le gène *AIGP1*, dont la séquence est identique à celle des gènes *TDE1* et *TMS-1* et qui code donc pour la même protéine. Enfin en 2003, le groupe de Player a identifié l'homologue humain du gène murin *TMS-2*, appelé *TDE2*. L'objectif de ce travail était d'identifier le profil d'expression génique chez des cellules tumorales provenant de tumeurs pulmonaires à grandes cellules (NSCLC) (267).

D'autres séquences homologues ont été décrites dans différents organismes, mais aucune étude fonctionnelle exhaustive n'a été à ce jour effectuée (Ensemble, The Wellcome Trust Sanger Institute; NCBI Ace View). L'appartenance des différentes protéines à la famille TDE1/TMS se fait principalement par homologie de séquence, puisqu'il n'existe encore aucun consensus dans la littérature pour une fonction commune à chacun des membres de la famille. De façon générale, c'est la région en N-terminal de la protéine qui est la plus conservée entre les différents membres de la famille, alors que la région en C-terminal est plus variable. La présence de plusieurs domaines hydrophobiques, d'une séquence signal en N-terminal, d'une séquence hélice-boucle-hélice de type myc entre les domaines transmembranaires 7 et 8, ainsi que la présence de plusieurs sites de glycosylation et de phosphorylation représentent d'autres caractéristiques communes à la plupart des membres de la famille de protéines TDE1/TMS.

5.0 Les objectifs de ce travail

L'objectif principal de mon projet était d'analyser le rôle de l'homologue humain du gène *TDE1* dans le processus de transformation cellulaire. Les études précédentes effectuées sur les souris transgéniques MT-PVLT-10, identifiaient le gène murin *TDE1* comme un candidat potentiel pouvant participer à la progression tumorale. En effet, l'expression du gène était augmentée chez la souris lors du passage d'un phénotype normal à un phénotype néoplasique. Or, l'un des mécanismes par lesquels certains gènes, en l'occurrence les oncogènes, acquièrent leur potentiel transformant, est justement représenté par une augmentation d'expression. *TDE1* pouvait donc par ce même mécanisme, contribuer à la tumorigénèse.

Notre premier objectif était d'identifier l'homologue humain du gène murin de *TDE1*, que nous avons nommé *hTDE1* et de caractériser son patron d'expression dans différentes tumeurs de même que dans différentes lignées cellulaires tumorales. Sauf quelques rares exceptions, les gènes d'origine murine et leurs homologues humains agissent de manière semblable au niveau des mécanismes cellulaires, suggérant donc que *hTDE1* pourrait à son tour être surexprimé dans certains cas de tumeurs.

La séquence primaire d'une protéine peut fournir plusieurs informations utiles à l'identification de sa fonction potentielle (28, 312). Il existe un certain nombre de domaines fonctionnels caractéristiques de chacune des familles protéiques. On peut citer par exemple les domaines BH (pour BCL2 Homology domain) de la famille de protéines bcl-2. Tout en caractérisant les membres d'une même famille, ils en déterminent un rôle. Ces domaines spécifiques peuvent par exemple représenter des sites d'interaction avec d'autres protéines connues, suggérant donc encore une fois un rôle potentiel pour la

protéine en étude. Par conséquent, un deuxième objectif de ce travail était d'analyser la séquence du gène et de la protéine dans le dessein de collecter le plus grand nombre d'informations possibles, susceptibles de nous donner des indices quant à sa fonction. L'analyse de séquence permet également de localiser la protéine au niveau cellulaire. Il existe un certain nombre de courtes séquences, qui lorsque présentes, vont diriger la protéine vers un compartiment cellulaire. On connaît par exemple des signaux de localisation au noyau, au réticulum endoplasmique, et à d'autres organelles. La localisation cellulaire permet donc de restreindre le nombre des activités auxquelles pourrait participer la protéine. Il est par exemple improbable qu'une protéine localisée à la membrane plasmique, ne possédant aucun domaine de localisation nucléaire ni de liaison à l'ADN puisse agir en tant que facteur de transcription.

Des résultats préliminaires suggéraient une participation du gène *TDE1* murin au processus de transformation puisque le gène était surexprimé dans des tissus et des lignées cellulaires issues de tissus néoplasiques. Mais cette observation ne nous permettait pas d'établir un rôle direct de la protéine dans la transformation cellulaire. Notre troisième objectif était donc de disséquer, *in vitro*, si la surexpression de l'homologue humain *hTDE1* pouvait perturber certaines des étapes essentielles à la progression tumorale. En effet, le processus de transformation comprend plusieurs composantes, et chacune s'entre elles contribue à l'avènement du cancer (134). Parmi les principales acquisitions de la cellule lors de la progression tumorale, nous avons donc voulu vérifier si la surexpression de *hTDE1* dans un modèle de fibroblaste de rat, pourrait induire la perte d'inhibition de contact, altérer la prolifération cellulaire, modifier la motilité et le potentiel invasif des cellules, et changer la réponse cellulaire à l'apoptose. Ce type d'expérience *in vitro* présente l'avantage de permettre l'étude ciblée

d'un seul paramètre, dans des conditions contrôlées et semblables d'une expérience à l'autre. Un changement de comportement de la cellule, suite à la surexpression de *hTDE1*, n'est pas synonyme d'une implication directe du gène dans l'une ou l'autre des composantes du processus de transformation, mais pourrait découler d'une interaction avec d'autres intermédiaires cellulaires. Il n'en demeure pas moins que l'information obtenue peut nous aider à formuler des hypothèses quant au rôle du gène dans la progression néoplasique.

Enfin, le quatrième objectif de notre travail était de déterminer si les caractéristiques que la cellule acquiert suite à l'expression de *hTDE1*, lui permettraient de générer des tumeurs *in vivo*. En effet, le vrai défi auquel est confrontée la cellule tumorale est de survivre, de se diviser et de se propager à l'intérieur d'un organisme. L'environnement auquel est exposée la cellule lors d'une expérience effectuée *in vitro* diffère significativement de la réalité qu'elle rencontre *in vivo*, par exemple suite à l'injection sous-cutanée dans des souris nues. Or, l'environnement est un facteur très important dans le processus de transformation (seed and soil hypothesis, Paget, 1889). Pour cette raison, le quatrième objectif de notre étude était de déterminer si des cellules surexprimant la protéine hTDE1 étaient capables d'induire l'apparition de tumeurs dans un modèle de souris nues.

Article 1

**The Human TDE Gene Homologue: Localization to 20q13.1-13.3 and Variable
Expression in Human Tumor Cell Lines and Tissue**

**Article publié dans la revue MOLECULAR CARCINOGENESIS,
Volume 26, p. 189-200, 1999**

**The Human TDE Gene Homologue: Localization to 20q13.1-13.3 and Variable
Expression in Human Tumor Cell Lines and Tissue**

Michela Bossolasco,¹ Michel Lebel,¹ Nicole Lemieux,² and Anne-Marie Mes-
Masson,^{1,3*}

¹Institut du cancer de Montréal et Centre hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital
Notre-Dame)

²Département de pathologie, Université de Montréal, Québec, Canada

³Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Michela Bossolasco and Michel Lebel contributed equally to the development of this
article.

Sequence data from this study have been deposited in the GenBank data library under
accession no. AF 112227.

*Correspondence to: Institut du cancer de Montréal et Centre hospitalier de l'Université
de Montréal (Hôpital Notre-Dame), 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec,
Canada H2L 4M1.

Key words: TDE gene homologue; chromosome 20; overexpression; lung cancer;
tumorigenesis

ABSTRACT

Expression of the mouse testicular tumor differentially expressed (*TDE*) gene is increased in testicular tumors as well as in testicular tumor cell lines derived from transgenic mice carrying the polyomavirus large-T antigen under the control of the metallothionein-1 promoter. To determine whether the *TDE* gene has a role in the development of human cancers, we used the mouse *TDE* cDNA sequence to screen a human placental cDNA library. The human *TDE* cDNA homologue coded for a protein that was 78% homologous to the mouse TDE amino acid sequence. Like the mouse TDE protein, the human TDE protein had several predicted hydrophobic α -helices characteristic of transmembrane proteins. The human *TDE* gene was expressed in all cell lines and tissues examined. Four mRNA species were observed in placenta, where we identified an alternate splicing pattern and the use of two different polyadenylation sites. Using fluorescence in situ hybridization analysis, we localized the human *TDE* gene to the q13.1-13.3 region of chromosome 20, a region known to be amplified in several types of human cancers. We then observed, by northern blot analysis, that human TDE expression was increased in three of five lung tumors examined.

INTRODUCTION

Several groups, including ours, have generated polyomavirus large-T antigen (PyLT-Ag) transgenic mice [1-8]. Our previous results with MT-PVLT transgenic mice, which harbor the PyLT-Ag under the control of the metallothionein promoter [5,6] indicated that PyLT-Ag expression alone is sufficient for the development of a neoplastic phenotype. Males expressing the transgene in their testes from birth develop tumors after 8 mo of age, which implies that tumorigenesis is a multistep process [6]. Therefore, our transgenic mouse model represents an excellent system for uncovering the events in addition to PyLT-Ag expression that are important in tumor progression. To identify these events, we have focused on genes that are differentially expressed during neoplastic progression, because these genes may be key players in tumor progression. Using the differential display technique [9,10], a number of groups have identified differentially expressed genes that are candidates for tumor progression in breast, ovary, stomach, prostate, cervix, and esophagus [9,11-17].

As a model system for studying differentially expressed genes in tumor progression, permanent cell lines from pre-adenomatous and post-adenomatous testes (D-37 and D-4 cells, respectively) from MT-PVLT-10 mice have been established and characterized [18]. Although all the cell lines express PyLT-Ag mRNA at similar levels, the tumorigenic potentials of the D-37 and D-4 cell lines are clearly different. Subcutaneous injection of D-4 cells into nude mice produces tumors in 7 wk, whereas D-37 cells are consistently unable to form tumors in nude mice even after a long latency period [18]. In addition, the T1-5 cell line was established from a tumor produced in nude mice by injections with the D-4 cell line. T1-5 cells produce tumors in 3 wk when

reinjecting into nude mice [19]. We have identified candidate genes whose pattern of amplification is different in the D-37, D-4, and T1-5 cell lines. One such candidate, the *Fas* antigen receptor, is downregulated during tumor progression [19]; a second candidate, the testicular tumor differentially expressed (*TDE*) gene, is upregulated in transformation [20].

Sequence analysis of the longest open reading frame of the mouse *TDE* cDNA demonstrated that this open reading frame codes for a novel protein containing hydrophobic α -helices [20]. Peptide analysis suggests that the hydrophobic domains of the *TDE* protein are most closely related to transmembrane α -helices of various integral proteins, including a number of serpentine-type receptors and proteins that participate in ion-channel formation. As the mouse *TDE* has been identified as a putative candidate gene in tumor progression, we were interested in characterizing the human homologue with the eventual goal of determining its possible implication in human tumor progression. Here we describe the isolation and sequence analysis of human *TDE* cDNAs as well as the chromosomal localization of this gene. cDNAs were isolated from a placental cDNA library. In this tissue, the human *TDE* gene produced four different *TDE* cDNAs that differed, in part, through the use of different polyadenylation signals and differential splicing. Using fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis, we determined that the *TDE* gene was localized to human 20q13.1-q13.3, a region known to be amplified in several human cancers. We have examined the pattern of human *TDE* expression in different human cell lines and tissues. All cell lines tested expressed human *TDE*, although the level of expression varied. Of particular note is the

observation that human *TDE* was expressed at higher levels in some lung tumor tissues when compared with their normal counterparts.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Tissue Culture

Lung tumor cell lines Calu-1, H23, QUDB, H82, H69, RG-1, H520, H157, LCT, and A549 and breast tumor cell lines Hs 578T, BT-549, T-47D, SK-BR-3, and MDA-MB-231 were a generous gift from Dr. E. Bradley (Institut du cancer de Montréal et Centre hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame) Montréal, Quebec, Canada). Breast cell lines MCF-7 and ZR-75-1 were provided by Dr. J. Jolivet (Centre hospitalier de l'Université de Montréal (Hôtel-Dieu), Montréal), and HeLa cells were obtained from Dr. B. Massie (Biotechnology Research Institute, Montréal). Cell lines LNCAP and PC3 were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA). The H23, QUDB, H69, RG-1, H520, H157, LCT, and T-47D cell lines were cultured in RPMI 1640. A549 was cultured in α -minimal essential medium. All other cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 μ g/mL gentamycin, and 2.5 μ g/mL fungizone. The cells were maintained at 37 °C under 5% CO₂.

RNA Purification and Northern Blot Analysis

RNA was isolated either by the guanidine thiocyanate/cesium chloride procedure [21] or with TRIzol reagent (Gibco/BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY). Purified RNA was quantified spectrophotometrically, and the quality was determined by ethidium bromide staining after agarose electrophoresis.

The northern blot of human placental poly(A⁺) RNA was a generous gift from Dr. M. Filion (Department of Pathology, Université de Montréal). The membranes containing the human normal lung and human tumor lung RNA samples were kindly provided by Drs. J. Viallet and M.-S. Tsao (Montréal General Hospital, Montréal). Membranes were hybridized overnight at 60 °C in 30% formamide; 0.35 M sodium phosphate, pH 7.2; 7% sodium dodecyl sulfate (SDS); and 1% bovine serum albumin with a random-primed [α 32-P]dCTP-labeled probe (specific for either human *TDE* or β -actin) and subsequently washed twice at 60 °C with 0.15 M sodium phosphate and 1% SDS. Autoradiograms were exposed to Kodak XAR-5 film (Eastman Kodak, Rochester, NY) overnight at -70 °C with an intensifying screen. To reprobe specific northern blots, the filters were treated at 80 °C for 1 h in 0.03 M sodium phosphate and 0.1% SDS. To ensure that the probe had been stripped, the membranes were exposed at -70 °C with an intensifying screen overnight.

For northern blots of lung cell lines, 20 μ g of total RNA was electrophoresed through a 1% agarose gel and subsequently electrotransferred in a Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) at 0.30 V in 1 x TAE buffer on a GeneScreen Plus hybridization transfer membrane (NEN Life Science Products, Boston, MA). The membranes were hybridized as described above. A probe corresponding to 28S ribosomal RNA was used as an internal control. For breast cell lines, transfer was performed according to a classic capillary-action protocol, and β -actin was used as an internal control.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was converted to single-stranded cDNA by using murine reverse transcriptase in a volume of 20 μ L containing 250 ng of antisense primer (complementary to mRNA), 0.5 mM dNTPs, 2 μ L of 10 x amplification buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.6; 1.5 mM $MgCl_2$; and 0.01% gelatin), and 37 U of RNA Guard (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The reaction was performed at 37 °C for 30 min. For the subsequent polymerase chain reaction (PCR), 250 ng of the sense primer, 3 μ L of 10 x amplification buffer, and 2.5 U Taq DNA polymerase (Pharmacia) were added to the reaction mixture, and the volume was readjusted to 50 μ L with water. The PCR conditions were 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min, and 70 °C for 2 min.

Primers for the mouse *TDE* sequence were designed from previously published sequence data [20]. The mouse *TDE* primer pair consisted of the 5' sense primer 5'-CCGGATCCTTCTGTGAAGGAGGATTTTC-3' and the 3' antisense primer 5'-GGCGGATCCGCTCAGATTCTGCATCAAG-3'. The amplified product was 1398 bp.

The human *TDE* primer pair was based on two expressed sequence tags (ESTs) that have more than 70% homology to the mouse *TDE* cDNA sequence. A partial human *TDE* cDNA fragment was amplified by using 5'-TCTGCTCATGTTCAAAGTAA-3' for the 5' sense primer and 5'-CGGATCCGTGTCCTTGGCACTCAGAGGT-3' for the 3' antisense primer. The primers were designed based on EST sequence information from GenBank. The amplified product was 1105 bp. The PCR fragments were cloned into the plasmid pBlueScript SK⁺[22] that had been modified into a TA vector. To make the pBlueScript TA cloning vector, *EcoRV*-cut vector was incubated with Taq DNA polymerase and 2 mM dTTP in 1 x amplification buffer (Pharmacia) for 2 h at 70 °C.

Reverse transcription (RT)-PCR was used to clone 5' mouse *TDE* sequences from MT-PVLT-10 transgenic mice testicular tumor RNA. Total RNA was converted to single-stranded cDNA by using murine reverse transcriptase in a volume of 20 μ L containing 36 ng of pd(N)6 random primers (Pharmacia), 0.5 mM dNTPs, 2 μ L of 10 x amplification buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.6; 1.5 mM MgCl₂; and 0.01% gelatin), and 37 U of RNA Guard (Pharmacia). The reaction was performed at 37 °C for 30 min. Five microliters of the RT reaction was used in a PCR in which 250 ng of the sense primer from the human sequence and 250 ng of the antisense primer from the mouse sequence were added to a 50 μ L final reaction volume containing 5 μ L of 10 x amplification buffer, 0.2 mM dNTPs, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Pharmacia). PCR was performed for 30 cycles at 94 °C for 1 min, 48 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min. The PCR fragments were cloned and sequenced by using the dideoxy chain termination method, and the reaction products were analyzed with Pharmacia automatic sequencer (Automated Laser Fluorescent (ALF); Pharmacia).

Screening of cDNA Libraries

A human placental cDNA library cloned into lambda uni-ZAP bacteriophage (Stratagene, San Diego, CA) was kindly provided by Dr. M. Filion and was used to isolate cDNA clones for *TDE*-specific mRNA. About 3×10^5 phage plaques were screened by using plaque hybridization techniques under stringent conditions with the partial human *TDE* cDNA obtained by RT-PCR. Plasmid DNA containing the cDNA fragment was excised from the phage according to the manufacturer's protocol

(Stratagene). Recombinant plasmids were cleaved with *EcoRI* and *XhoI* and electrophoresed in a 0.8% (w/v) agarose gel to determine the size of cDNA inserts.

All enzymatic reactions were performed as described by the manufacturers. Standard protocols for cDNA library screening, agarose gel electrophoresis, and plasmid preparation were used [22]. Several clones were sequenced as described above.

FISH

High-resolution FISH was used to map the gene coding for *TDE*. We used a technique for mapping genes directly to banded human chromosomes [23]. Metaphase chromosomes were obtained from synchronized lymphocytes from normal human peripheral blood. The cells were synchronized with thymidine and treated with 5-bromodeoxyuridine during the last part of S phase to produce R banding [24]. The probe used for FISH was derived from the human *TDE* cDNA and corresponds to nt 97-1124. The biotin-labeling reaction was performed by nick translation (Bionick kit; BRL). After hybridization, the probe was visualized by indirect immunofluorescence, and R banding was performed by adding the anti-fading agent p-phenylenediamine (pH 11) as previously described [23]. Hybridization signals were considered positive when present in at least one chromatid.

RESULTS

Identification and Characterization of Human *TDE* cDNA Clones

In an earlier study of MT-PVLT-10 mice, we identified a gene called *TDE* that was expressed at higher levels not only in testicular tumor cell lines derived from the transgenic mice but in tumor tissues from the same and other transgenic lines [18,20]. To clone and characterize the human *TDE* homologue, the mouse cDNA *TDE* sequence [20] was compared with GenBank sequences. Twenty-one overlapping human *TDE*-related ESTs from either human fetal or placental libraries were identified. These ESTs were 75-85% homologous to the mouse *TDE* sequence. A pair of oligonucleotide primers was synthesized (see Materials and Methods) based on two ESTs to conduct RT-PCR on total RNA from the human lung cancer cell line Calu-1. An RT-PCR product of 1.1 kb was amplified and cloned into a pBlueScript vector. The sequence of this fragment had approximately 81% homology to the mouse *TDE* sequence and was considered a partial human *TDE* cDNA sequence. This cDNA fragment was used to probe a northern blot containing 10 μ g of poly(A⁺) RNA from human placental tissues. Four mRNA species were detected (Figure 1), and thus a human placental cDNA library was screened to isolate potential cDNA clones corresponding to human *TDE*.

The partial human *TDE* cDNA fragment was used to screen the human placental cDNA library under stringent conditions. Over 20 positive plaques were isolated for further analysis. Several clones were sequenced entirely, and the compilation of these sequences is presented in Figure 2. Together, the cDNA clones provided a contiguous sequence of 1899 nt. The last 17 nucleotides were adenine residues and probably correspond to the poly(A⁺) tail. Two clones (1-1 and 8-2) had the complete sequence, as

shown in Figure 2. One clone (4-1) had a poly(A⁺) tail beginning at nt 1558 (Figure 2). Although there was no obvious AATAAA polyadenylation signal at this site, this result nonetheless suggests that the human *TDE* gene has two polyadenylation signals and that mRNA species with a shorter 3' untranslated region can be synthesized. In addition, the 4-1 clone also had a deletion of 183 nt spanning nt 1028-1212 (Figure 2), suggesting that alternatively spliced forms of the human *TDE* gene may exist.

The longest possible open reading frame was 1419 nt (Figure 2). The sequence surrounding the first AUG codon (at nt 77: see Figure 2) contained an adenine at nt -3 and a guanine at nt +4 relative to the initiation codon; this matches well with the consensus sequence for translation initiation sites [25]. Indeed, eight of nine nucleotides (TCACCATGG) corresponded precisely to the Kozak consensus sequence. There was an in-frame stop codon upstream of the first AUG, suggesting that translation initiates at this codon. The predicted protein product consisted of 473 amino acids with a total estimated molecular mass of 52 kDa. The deletion observed in the 4-1 clone removed 61 amino acids, resulting in a shorter protein of 412 amino acids with an estimated molecular weight of 45.3 kDa. Half of the sequenced cDNA clones had a guanine instead of an adenine at nt 1386 (Figure 2), indicating that this position was polymorphic in humans and resulted in the presence of either threonine or alanine at this position. Moreover, the presence of a guanine instead of an adenine also introduced *BalI* and *EaeI* restriction sites at this position in the human *TDE* gene.

Peptide analysis of the *TDE* protein revealed that 49% of the protein was composed of hydrophobic residues. Hydropathy analyses [26-28] classified the human *TDE* protein as an integral membrane protein. Nine hydrophobic domains were identified by the Eisenberg method; seven of these domains are predicted to be

transmembrane helices (α -helices II, III, IV, V, VI, VIII, and IX; Figure 3). Together, these features are consistent with the human TDE protein being associated with a membrane. There are also eight potential casein kinase II phosphorylation sites (Figure 3) and four potential protein kinase C phosphorylation sites, including the threonine at nt 437 that was replaced by an alanine in the polymorphic form of the cDNA (see Figure 3). Seven of these sites corresponded to phosphorylation sites in the mouse protein [20].

Comparison of Mouse and Human TDE cDNAs

A comparison of the human TDE protein sequence with the Swiss protein data bank revealed no significant homology to known protein sequences except to the mouse TDE protein (78% homology) and to a rat developmentally regulated protein (66% homology) that has an unknown function. In addition, other sequence analysis programs failed to identify any characteristic motifs in the human TDE protein, including motifs described for the immunoglobulin superfamily, membrane-associated kinases, and nucleotide-binding proteins.

Human TDE was found to possess an additional 80 amino acids at the N terminus when compared with the mouse protein. As this suggested that sequences were missing from the 5' end of the mouse *TDE* cDNA, RT-PCR was performed on mouse mRNA from testicular tumor tissues to identify sequences upstream of the known mouse *TDE* coding sequence [20]. The additional mouse sequences were cloned in an appropriate vector and sequenced. The complete 472 amino acid sequence of the mouse TDE protein was then compared with the 473 amino acids of the human TDE protein (Figure 4). The comparison analysis indicated that the human TDE protein had 78% homology to the mouse TDE protein. Many of the amino acid changes between mouse

and human TDE proteins were conservative, and if these changes are taken into account, the human amino acid sequence was 86% homologous to the mouse protein. One obvious difference between the mouse and human TDE protein was observed at amino acid 379 of the human protein (Figure 4). Three threonine residues were followed by a serine in the human protein, whereas the mouse TDE possessed only two threonine residues followed by an asparagine at a similar position in the protein (Figure 4), which explains the one amino-acid size difference between the mouse and human TDEs. Interestingly, the third threonine residue in the human TDE was retained and formed the 3' end in the placental cDNA in which 61 amino acids have been deleted (Figures 2 and 4). In addition, the amino acids retained at the N-terminal end of the 61 amino acid deletion were very different from the sequence at a similar position (amino acid 317) in the mouse TDE protein (Figure 4). RT-PCR analysis with appropriate oligonucleotides did not reveal a similar spliced mRNA species in mouse (data not shown). This putative splicing in the human TDE mRNA removed a proline-rich region and one hydrophobic domain of the human protein (Figure 3).

Chromosomal Assignment of the Human *TDE* Gene

Localization of the human *TDE* gene was performed by FISH analysis to determine whether this gene is situated in a chromosomal region known to be rearranged and involved in tumors or in other human diseases. Localization of the human *TDE* gene was established by analysis of 100 randomly selected metaphases. About 95% of the metaphases exhibited at least one signal, and 62% showed a fluorescent spot on both chromatids on the long arm of chromosome 20 (Figure 5A and B). The background was

low, and no specific secondary sites were found. The localization was defined to be 20q13.1, and more precisely 20q13.11.

Human *TDE* mRNA Expression Pattern

Northern blot analysis was performed with total RNAs from different tissues and several human cell lines to determine the pattern of expression of the human *TDE* gene. Like the mouse *TDE* gene, the human *TDE*-specific mRNAs were synthesized by all tissues and cell lines examined (Figures 6-8 and data not shown). These included cell lines and tissues from prostate, ovaries, ascites, colon, liver, mammary glands, and lung. The mouse *TDE* gene is known to be overexpressed in testicular tumors from transgenic mice expressing PyLT-Ag. Samples from human ovarian, prostate, and lung cancer tissues, but not testicular tumor tissues, were available for analysis. There was no difference in the expression of human *TDE* between normal and tumoral ovarian tissues or between normal and tumoral prostate tissues (data not shown). However, northern blot analysis demonstrated some differences in human *TDE* mRNA expression between normal lung and tumor tissues in some patients (Figure 8). As demonstrated in Figure 8A, most of the samples expressed a common isoform, although alternate transcripts were present in some samples. However, there was no correlation between the tumor pathology and the mRNA species expressed in the tissues. Densitometric analysis on normal and tumor RNA from patients 2, 3, and 5, using β -actin expression as the standard, revealed a fourfold to tenfold increase in *TDE* expression (Figure 8B). In the limited number of samples tested, no correlation was found between the level of *TDE* expression and tumor pathology.

DISCUSSION

Starting with testicular cell lines representing preneoplastic and neoplastic states of the disease in MT-PVLT-10 mice [18], we have begun to define secondary events important in tumor progression in our transgenic mice. For this reason, we cloned and characterized a differentially expressed message (*TDE*) overexpressed in testicular adenomas [20]. Because experiments indicated that this mouse *TDE* sequence could recognize several mRNAs in human cells, some of which were expressed at higher levels in some pulmonary tumors, we screened a placental cDNA library knowing that placental tissues express all the mRNA forms specific to human *TDE*.

Several positive clones were recovered from the cDNA placental library, two of which contained the entire coding sequence of the human gene. The longest open reading frame coded for a 473 amino acid protein. Five-prime sequences completing the mouse *TDE* coding sequence were also determined. The mouse complete coding sequence codes for 472 amino acids. Comparison analysis between the human and mouse protein, taking into account all the conserved amino acid changes (86% overall homology), suggested that the tridimensional structure of both proteins was identical. The *TDE* gene sequence was well conserved between mouse and human, although two major differences existed between the mouse and the human mRNAs. The human gene had two alternative polyadenylation sites giving rise to human mRNAs with different 3' untranslated regions. The mouse gene has only one polyadenylation site [20], and the 3' untranslated region of the mouse *TDE* mRNA is twice the length of the longest possible 3' untranslated region in human *TDE* mRNA (data not shown).

The second major difference between human and mouse mRNAs is that the human gene synthesized mRNA species in which an alternative splicing event removed an exon 61 amino acids long. No such splicing event has been detected with the *TDE* gene in mouse tissues, not even with the sensitive RT-PCR assay. The 3' end splicing event present in the human mRNA occurred just upstream of the third threonine absent in the mouse TDE protein (Figure 4). In addition, the 5' end of the exon being spliced out in human *TDE* mRNA was different from the corresponding position in the mouse *TDE* coding sequence (Figure 4). The different mRNA species detected by northern blot analysis of placental tissues can be explained by this splicing event and by the two polyadenylation sites in human *TDE*.

Like the mouse TDE protein, the human protein had several hydrophobic α -helices. Both mouse and human *TDE* cDNAs encoded novel proteins with no significant homology to known proteins. Although TDE was 66% homologous to a rat developmentally regulated protein, the function of this rat protein is unknown. Peptide analysis suggested that the hydrophobic domains of the TDE proteins were most closely related to transmembrane α -helices of various integral proteins, including a number of transmembrane receptors and proteins that participate in ion-channel formation. Interestingly enough, the splicing event in the human *TDE* gene removed a proline-rich region and one hydrophobic domain. Functional analysis is required to determine whether this splicing event has a functional effect on the human TDE protein. Overexpression of each species of human *TDE* cDNAs in appropriate mammalian cells will reveal if they have transforming potentials similar to that of the mouse *TDE* cDNA.

Human *TDE* mRNA expression was detected in all the cell lines and tissues examined (Figures 6-8 and data not shown). The mouse *TDE* gene is expressed in all tissues of the mouse [20]. These preliminary results suggest that human *TDE* is also expressed ubiquitously. The mouse *TDE* cDNA was previously cloned and characterized because it is overexpressed in testicular tumors derived from our PyLT-Ag model [20]. Lung, prostate, and ovarian tumors but not human testicular tumor tissues were available for analysis of expression of human *TDE* mRNAs. There was no difference between normal tissues and tumor tissues of prostate or ovarian origin (data not shown). However, some lung-tumor tissues showed an increase in human *TDE* expression (Figure 8). Tumor tissues and adjacent normal tissues from five patients were analyzed. Samples from three patients indicated that *TDE* expression levels were increased fourfold to tenfold in lung tumor tissues compared with normal pulmonary tissues (Figure 8). Additional analyses were performed on other patients with lung cancer, although no normal tissues were available. These analyses indicated that *TDE* expression levels were higher than the levels recorded in the normal pulmonary tissues of the five patients mentioned in this study (data not shown). Analysis of more normal lung and tumor samples is required to determine the importance of *TDE* overexpression during lung tumorigenesis. In situ hybridization analysis could also estimate the differences in *TDE* expression between tumor cells and surrounding normal cells in histological sections of lung cancer.

Small cell lung carcinomas, non-small cell lung carcinomas, adenocarcinomas, and squamous tumors were analyzed, but no correlation between tumor pathology and expression of *TDE* was found. Some patients expressed all four *TDE* mRNA species, and others expressed only one (Figure 8A); but there was no correlation between the

mRNA species being expressed and the tumor types. Additional analyses of patients with different lung tumor pathologies are required.

Localization of human *TDE* was conducted to determine whether the gene is situated in a chromosomal region known to be rearranged in human cancers. FISH analysis demonstrated that the human *TDE* gene mapped to region q13.1-q13.3 of chromosome 20 (Figure 5). The murine *TDE* gene mapped to the mouse chromosome 2 (data not shown). This finding is not surprising, because several genes mapped to human chromosome 20 have a murine homologue that maps to the distal portion of mouse chromosome 2 [29-34]. Thus, the human *TDE* gene lies in a region of chromosome 20 that is conserved on chromosome 2 in the mouse.

Chromosome 20 is known to be rearranged in some human cancers. Several cases of trisomy 20 have been reported in both hepatoblastomas and childhood embryonal rhabdomyosarcoma, which are malignant diseases associated with Beckwith-Wiedemann syndrome [35-37]. Presently, 20q amplification in lung cancers has not been described. In contrast, several studies have reported that a portion of the long arm of chromosome 20 can be amplified in breast tumors. For example, comparative genomic hybridization studies have indicated that 18% of primary breast carcinomas have amplifications within region 20q13 and 40% of breast tumor cell lines examined have amplifications within region 20q12-q13 [38,39]. These comparative genomic hybridization studies suggested that the region 20q13 contains an oncogene that has not yet been discovered [40]. Amplification of a portion of a chromosome may lead to abnormally high expression of a proto-oncogene in tumors [41]. Northern and Southern blot analyses were performed on breast cancer cell lines with the human *TDE* cDNA probe. No rearrangement within genomic *TDE* sequences were detected by Southern

analysis (data not shown). MCF-7 and ZR-75-1 breast tumor cell lines contain a 20q amplification [38,39]. When *TDE* expression was compared, MCF-7 and ZR-75-1 revealed no significant differences when compared with breast tumor cell lines in which 20q amplification has not been noted [39]. FISH analyses with the human *TDE* cDNA on a panel of breast cancer cell lines and primary tumors known to have amplifications within region 20q13 may reveal involvement of this gene in breast cancer.

In summary, our results indicated that all human cells examined expressed *TDE* messages coding for a protein that was 78% homologous to the mouse TDE protein. Characterization of the different cDNA clones also showed that the human gene could produce a spliced form of the protein. The functions of these proteins are unknown, but they have several hydrophobic regions closely related to transmembrane α -helices of various integral proteins, including a number of transmembrane receptors and proteins that participate in ion-channel formation. Our results on lung cancer tissue samples indicated overexpression of *TDE* compared with normal lung tissues, although this data was not reproduced in lung tumor cell lines. The discrepancy between the *in vivo* and *in vitro* levels of expression could be explained if we consider that in lung, as well as in testis, hormone stimulation is an important process, and several autocrine loops have been identified. It may be that both the selective pressure for *TDE* overexpression and its advantage in tumor growth are absent *in vitro*, where growth conditions are quite different. Several approaches, including an *in vivo* transgenic approach, will be undertaken to directly determine *TDE* involvement in tumorigenicity. Finally, the human *TDE* gene mapped to q13.1-13.3 of chromosome 20. This region of chromosome 20 is known to be amplified in several human cancers. We will undertake studies to determine whether the human *TDE* gene is amplified in these cancers as well as in human lung and

testicular cancers. The expression of *TDE* in breast cancer cell lines that carry an amplification of 20q13 deserves a more accurate analysis in breast tumor cell lines and tissues samples, as amplification is one of the known mechanism involved in overexpression of proto-oncogenes leading to cellular transformation.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. M. Filion for the human placental cDNA library, for the northern blot containing the placental poly(A⁺) RNA, and for helpful technical advice. We thank Drs. J. Viallet and M.-S. Tsao for the northern blots containing samples of lung tumors and Johane Morin for kind collaboration. We would like to acknowledge the technical assistance of Annie Bilodeau in performing the FISH analyses. We are grateful to Dr. R. Brousseau for protein sequence analyses and to Dr. L. Masson for the northern blot densitometric analyses. We are also grateful to Drs. Masson and R. Kothary for reading the manuscript and providing helpful comments. This research was supported by an Medical Research Council of Canada (MRC) grant to A-MM-M, who is also the recipient of an Fonds de la recherche en Santé du Québec (F.R.S.Q.) fellowship. The portion of the work related to FISH analysis was supported by funding from the "Recherche et Diagnostique en Cytogénétique" (REDICY, Inc.,) to NL. Both ML and MB are recipients of (MRC) studentships. ML was also supported by an Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'aide à la Recherche (FCAR) studentship.

REFERENCES

1. Rassoulzadegan M, Leopold P, Vailly J, Cuzin F. Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strains. *Cell* 1986;46:513-519.
2. Bautch VL, Toda S, Hassell JA, Hanahan D. Endothelial cell tumors develop in transgenic mice carrying polyoma virus middle T oncogene. *Cell* 1987;51:529-537.
3. Bautch VL. Effects of polyoma virus oncogenes in transgenic mice. *Mol Biol Med* 1989;6:309-317.
4. Jensen NA, Baron-Van Evercooren A, Mattei MG, et al. Neurological disorder in transgenic mice that express the large T antigen of polyoma virus in the nervous system. *Mol Biol Med* 1989;6:493-500.
5. Chalifour LE, Gomes ML, Wang NS, Mes-Masson AM. Polyomavirus large T-antigen expression in heart of transgenic mice causes cardiomyopathy. *Oncogene* 1990;5:1719-1726.
6. Chalifour LE, Mes-Masson AM, Gomes ML, Wang NS. Testicular adenoma and seminal vesicle engorgement in polyomavirus large-T antigen transgenic mice. *Mol Carcinog* 1992;5:178-189.
7. Griep AE, Kuwabara T, Lee EJ, Westphal H. Perturbed development of the mouse lens by polyomavirus large T antigen does not lead to tumor formation. *Genes Dev* 1989; 3:1075-1085.
8. Lebel M, Webster M, Muller WJ, Royal A, Gauthier J, Mes-Masson AM. Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19

promoter develop bronchiolar papillary tumors with progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth Differ* 1995;6:1591-1600.

9. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-971.

10. Liang P, Averboukh L, Pardee AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: Refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 1993;21: 3269-3275.

11. Graber MW, Schweinfest CW, Reed CE, Papas TS, Baron PL. Isolation of differentially expressed genes in carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol* 1996;3:192-197.

12. Yang X, Nakao Y, Pater MM, Pater A. Identification of two novel cellular genes associated with multistage carcinogenesis of human endocervical cells by mRNA differential display. *Carcinogenesis* 1996;17:563-567.

13. Chen Z, Sager R. Differential expression of human tissue factor in normal mammary epithelial cells and in carcinomas. *Mol Med* 1995;1:153-160.

14. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:4598-4602.

15. Sager R, Anisowicz A, Neveu M, Liang P, Sotiropoulou G. Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J* 1993;7: 964-970.

16. Blok LJ, Kumar MV, Tindall DJ. Isolation of cDNAs that are differentially expressed between androgen-dependent and androgen-independent prostate carcinoma cells using differential display PCR. *Prostate* 1995;26:213-224.

17. Salesiotis AN, Wang CK, Wang CD, Burger A, Li H, Seth A. Identification of novel genes from stomach cancer cell lines by differential display. *Cancer Lett* 1995;91:47-54.
18. Lebel M, Mes-Masson AM. Establishment and characterization of testicular cell lines from MT-PVLT-10 transgenic mice. *Exp Cell Res* 1994;213:12-19.
19. Lebel M, Bertrand R, Mes-Masson AM. Decreased Fas antigen receptor expression in testicular tumor cell lines derived from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *Oncogene* 1996;12:1127-1135.
20. Lebel M, Mes-Masson AM. Sequence analysis of a novel cDNA which is overexpressed in testicular tumors from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *DNA Seq* 1994;5:31-39.
21. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-5299.
22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
23. Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 1992;59:311-312.
24. Drouin R, Lemieux N, Richer CL. High-resolution R-banding at the 1250-band level
1. Technical considerations on cell synchronization and R-banding (RHG and RBG). *Cytobios* 1988;56:107-125.
25. Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 1987;15: 8125-8148.

26. Argos P, Rao JK, Hargrave PA. Structural prediction of membrane-bound proteins. *Eur J Biochem* 1982;128: 565-575.
27. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;157: 105-132.
28. Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:140-144.
29. Rao VV, Loffer C, Hansmann I. The gene for the novel vasoactive peptide endothelin 3 (EDN3) is localized to human chromosome 20q13.2-qter. *Genomics* 1991;10: 840-841.
30. Hendricks-Taylor LR, Bachinski LL, Siciliano MJ, et al. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics* 1992;14: 12-17.
31. Yu H, Thun R, Chandrasekharappa S, Trent JM, Zhang J, Meisler MH. Human PCK1 encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase is located on chromosome 20q13.2. *Genomics* 1993;15:219-221.
32. Steinlein O, Smigrodzki R, Lindstrom J, et al. Refinement of the localization of the gene for neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit (CHRNA4) to human chromosome 20q13.2-q13.3. *Genomics* 1994;22: 493-495.
33. Williamson CM, Dutton ER, Beechey CV, Peters J. Protective protein for beta-galactosidase, Ppgb, maps to the distal imprinting region of mouse chromosome 2 but is not imprinted. *Genomics* 1994;22:240-242.

34. Melis R, Stauffer D, Zhao X, et al. Physical and genetic localization of a Shab subfamily potassium channel (KCNB1) gene to chromosomal region 20q13.2. *Genomics* 1995;25: 285-287.
35. Wang-Wuu S, Soukup S, Ballard E, Gotwals B, Lampkin B. Chromosomal analysis of sixteen human rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 1988;48:983-987.
36. Scrable H, Witte D, Shimada H, et al. Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chrom Cancer* 1989;1:23-35.
37. Fletcher JA, Kozakewich HP, Pavelka K, et al. Consistent cytogenetic aberrations in hepatoblastoma: A common pathway of genetic alterations in embryonal liver and skeletal muscle malignancies? *Genes Chrom Cancer* 1991; 3:37-43.
38. Guan XY, Meltzer PS, Dalton WS, Trent JM. Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nature Genet* 1994;8:155-161.
39. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, et al. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2156-2160.
40. Pinkel D. Visualizing tumor amplification. *Nature Genet* 1994;8:107-108.
41. Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991;254:1153-1160.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of *TDE* sequences in human placenta. Ten micrograms of poly(A⁺) RNA was loaded. A radiolabeled DNA fragment corresponding to a 1.1-kb PCR fragment specific to the human *TDE* gene (see Materials and Methods) was used to probe the northern blot. Arrows indicate the four mRNA species detected.

Figure 2. Nucleotide sequence of the human *TDE* mRNA. The first nucleotide not derived from the *EcoRI* linker used to clone the cDNAs is referred to as nt 1. The amino acid sequence derived from the cDNA sequence, assuming initiation of translation at nt 76, is included. The sequence between the arrows represents an exon of 183 nt (or 61 amino acids) absent from some cDNA clones identified in the placental library. The asterisk at nt 1386 indicates an adenine replaced by a guanine in half of the cDNA clones sequenced. This polymorphism in humans caused a change from a threonine to an alanine in the protein (not shown in the figure). Nt 1598 is the site of an alternative polyadenylation signal found in some cDNA clones from the placental library. The underlined sequences represent potential polyadenylation signals. The PCR fragment used to probe northern blots and the human placental cDNA library was amplified from nt 416-1521 of the human *TDE* cDNA sequence.

Figure 3. Amino acid sequence of human TDE protein. The nine potential transmembrane α -helices are underlined and numbered in roman numerals. Black circles and white circles indicate potential protein kinase C phosphorylation sites and casein kinase II phosphorylation sites, respectively. The phosphorylation sites that are

conserved between the human and the mouse TDE proteins are labeled with asterisks. Amino acid numbers are given on the right.

Figure 4. Amino acid sequence homology between the human and mouse TDE proteins. Two dots indicate similar amino acids, and one dot represents amino acid changes. One threonine is absent in the mouse TDE protein and is represented by a hyphen at position 378. Amino acid numbers are given on the right.

Figure 5. Localization of the human *TDE* gene by fluorescence in situ hybridization to the q13.1-13.3 region of human chromosome 20.

Figure 6. Expression of human *TDE* in breast tumor cell lines. (A) Northern blot analysis of the *TDE* mRNAs expressed in MCF-7, ZR-75-1, MB-MDA-231, SKBR3, T-47D, BT-549, and H557t breast tumor cell lines. The radiolabeled 1.9-kb digestion product corresponding to full-length human *TDE* was used to probe the northern blot (top panel). After exposure to x-ray film, the blot was stripped and reprobed with a radiolabeled DNA sequence corresponding to the β -actin gene (bottom panel). (B) Histogram representing densitometric scanning analysis of the northern blots shown in panel A. The relative mRNA expression (y axis) from individual samples is presented as the ratio of the *TDE* signal to the β -actin control.

Figure 7. Expression of the human *TDE* gene in tumor cell lines. Shown is a histogram representing densitometric scanning analysis of a northern blot (not shown) of different

lung, breast, and prostate tumor cell lines. The relative mRNA expression (y axis) from individual samples is presented as the ratio of the *TDE* signal to the human 28S ribosomal gene.

Figure 8. Expression of human *TDE* in lung cancer. (A) Northern blot analyses of *TDE* mRNAs expressed in five different patients with lung cancer. Normal (N) and tumor tissues (T) are indicated in patients 1-5. The radiolabeled 1.1-kb PCR fragment from human *TDE* cDNA was used to probe a northern blot (top panel). After exposure to x-ray film, the blot was stripped and reprobed with a radiolabeled DNA sequence corresponding to the β -actin (bottom panel). (B) Relative expression of human *TDE* mRNA in five patients with lung cancer. The histogram represents the densitometric scanning analysis of the northern blots in panel A. Densitometry was performed on different exposures under non-saturating conditions. The results are presented as the ratios of *TDE* mRNAs to β -actin.

Figure 1, Bossolasco et al.

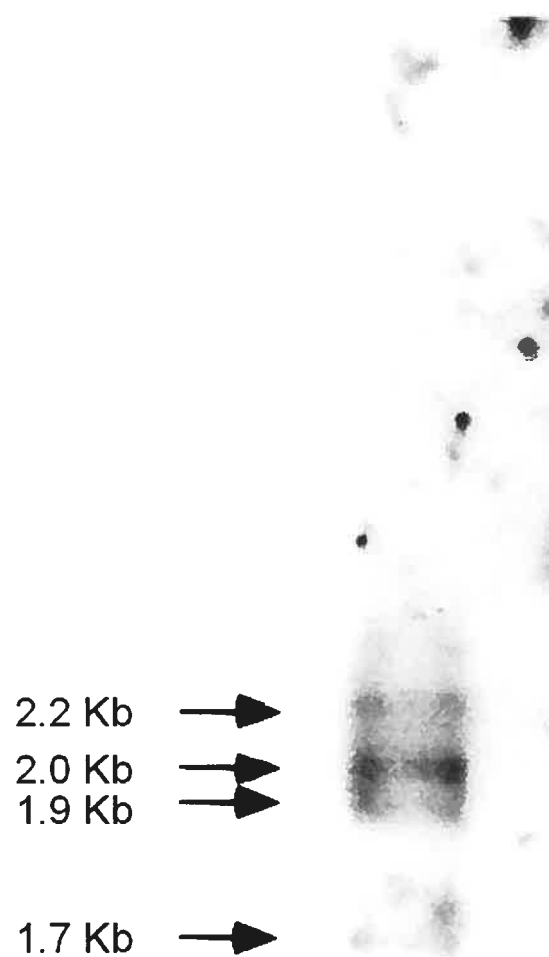


Figure 2, Bossolasco et al.

GGCACGAGCTCAGCTGGCAGTTACCACCGTGTTAGAAAGCAGCCTCAGGACCGGCCACCTCCATCACTGGCGTCACCATGGGGGCT
 MetGlyAla 86
 GTGCTGGGTGCTCTTCCCTCGCCAGCTGGGTTCATGCCTCTGCAGCGGTGCCTCATGTTTCTGTGTAGTTGCTGTCTTAACAG 172
 ValLeuGlyValPheSerLeuAlaSerTrpValProCysLeuCysSerGlyAlaSerCysLeuLeuCysSerCysCysProAsnSe
 TAAGAATTCCACGGTGACTCGCCTCATTATGCTTTTCTCTCTCTGAGCACTGTCGTATCCTATATCATGCAGAGAAAAGAGA 258
 rLysAsnSerThrValThrArgLeuIleTyrAlaPheIleLeuLeuLeuSerThrValValSerTyrIleMetGlnArgLysGluM
 TGGAACTTACTTGAAGAAGATTCTGGATTTTGTGAAGGGGATTAAAAATCCATGAGGCTCATATAAATGCAGATAAAGATTGT 344
 etGluThrTyrLeuLysLysIleProGlyPheCysGluGlyGlyPheLysIleHisGluAlaAspIleAsnAlaAspLysAspCys
 GATGTGCTGGTTGGTTATAAAGCTGTGTATCGGATCAGCTTTGCCATGGCCATCTTTTCTTGTCTTTCTCTGCTCATGTTCAA 430
 AspValLeuValGlyTyrLysAlaValTyrArgIleSerPheAlaMetAlaIlePhePhePheValPheSerLeuLeuMetPheLy
 AGTAAAAACAAGTAAAGATCTCCGAGCGGCAGTACACAATGGGTTTTGGTTCTTCAAAATTGCTGCCCTTATTGGAATCATGGTTG 516
 sValLysThrSerLysAspLeuArgAlaAlaValHisAsnGlyPheTrpPhePheLysIleAlaAlaLeuIleGlyIleMetValG
 GCTCTTTCTACATCCCTGGGGGCTATTTAGCTCAGCTCGGTTGTTGTTGGCATGATAGGGGCCGCCCTCTTCATCCTCATTGAG 602
 lySerPheTyrIleProGlyGlyTyrPheSerSerValTrpPheValValGlyMetIleGlyAlaAlaLeuPheIleLeuIleGln
 CTGGTGTCTGCTGGTAGATTTTGTCTATTCTTGGAAATGAATCATGGGTAAATCGAATGAAGAAGGAAACCCAGGTTGTGGTATGC 688
 LeuValLeuLeuValAspPheAlaHisSerTrpAsnGluSerTrpValAsnArgMetGluGluGlyAsnProArgLeuTrpTyrAl
 TGCTTTACTGTCTTTACAAGCGCCTTTTATATCCTGTCAATCATCTGTGTGGGCTGCTCTATACATATTACACCAAACAGATG 774
 aAlaLeuLeuSerPheAlaPheTyrIleLeuSerIleIleCysValGlyLeuLeuTyrThrTyrTyrThrLysProAspG
 GCTGCACAGAAAACAAGTTCTTCATCAGTATTAACTGATCCTTTGCGTTGTGGCTTCTATTATATCGATCCACCCAAAAATTCAG 860
 lyCysThrGluAsnLysPhePheIleSerIleAsnLeuIleLeuCysValValAlaSerIleIleSerIleHisProLysIleGln
 GAACACCAGCCTCGCTCCGGCCTCTTGCAGTCTCCCTCATCACCTCTACACTATGTACCTCACCTGGTCAGCCATGTCCATGA 946
 GluHisGlnProArgSerGlyLeuLeuGlnSerSerLeuIleThrLeuTyrThrMetTyrLeuThrTrpSerAlaMetSerAsnGl
 ACCTGATCGTTCTCTGCAATCCCAACCTGATGAGCTTTATTACAGCATAAATGCACCAACCTGGCTCCTGGAAATTCACATGCTG 1032
 uProAspArgSerCysAsnProAsnLeuMetSerPheIleThrArgIleThrAlaProThrLeuAlaProGlyAsnSerThrAlaV
 TGGTCCCTACCCCTACTCCACCATCAAAGAGTGGGTCTTTACTGGATTGAGATAATTTTATTGGACTGTTTGTCTTTGTTCTCTGC 1118
 aValProThrProThrProProSerLysSerGlySerLeuLeuAspSerAspAsnPheIleGlyLeuPheValPheValLeuCys
 CTCTTGATTCTAGCATCCGCACTTCCACTAATAGCCAAGTAGACAAGCTGACCCCTGTCAGGGAGTGACAGCGTCATCCTTGGTGA 1204
 LeuLeuTyrSerSerIleArgThrSerThrAsnSerGlnValAspLysLeuThrLeuSerGlySerAspSerValIleLeuGlyAs
 TACAACCTACCACTGGTGCCAGTGATGAAGAAGATGGACAGCCTCGGCGGGCTGTGGACAACGAGAAAGAGGGAGTGCAGTATAGCT 1290
 pThrThrThrSerGlyAlaSerAspGluGluAspGlyGlnProArgArgAlaValAspAsnGluLysGluGlyValGlnTyrSerT
 ACTCCTTATTCCACCTCATGCTCTGCTTGGCTTCCTTGTACATCATGATGACCTGACCAGCTGGTACAGCCCTGATGCAAGTTT 1376
 yrSerLeuPheHisLeuMetLeuCysLeuAlaSerLeuTyrIleMetMetThrLeuThrSerTrpTyrSerProAspAlaLysPhe
 CAGAGCATGACCAGCAAGTGGCCAGCTGTGTGGGTCAAGATCAGCTCCAGCTGGGTCTGCCTCCTGCTTTACGTCTGGACCTTGT 1462
 GlnSerMetThrSerLysTrpProAlaValTrpValLysIleSerSerSerTrpValCysLeuLeuLeuTyrValTrpThrLeuVa
 GGCTCCACTTGTCTCACCAGTCGGGACTTCAGCTGAACCTCTGAGTGCCAAGGACACCACTGGAACCTCACAAAGGCTCTCCTTCAC 1548
 lAlaProLeuValLeuThrSerArgAspPheSerEnd
 CGAAAACCCATATACCTTTTAAAGTTTGTTCAACTAAATATTAAGTGAATGCTTTGCAAGTTTGACTGTATGAGGTTTATATCA 1634
 GAAGGTGAGATTGAATAATGCTTGATGCAGAATCGAACTTCTCATTATCTGTATATTATGTTTACTTCTAAGGATATAGCACAA 1720
 AGGGAACATTTTTTGTTTAAAGTGAACCTACAGCTGTGCTGTGAAGAGAGTTCTTTATAAAGCCTGTAGGTTCTTTTAACTTTGGTT 1806
 TAAATGTAAGATAGGAAATGTTGGATATTGAGGCCATGCTTAATATATTATATTGACAGTATCCTTTAAAGCAAAAAAAAAA 1892

Figure 3, Bossolasco et al.

I II
MGAVLGVFSLASWVPCLCSGASCLLCSCCPNSKNSTVTRLIYAFILLST 50
VVSYIMQKEMETYLKKIPGFCEGGFKIHEADINADKDCDVLVGKAVYR 100
 III ♂
ISFAMAIFFFVFSLLMFVKVTSKDLRAAVHNGFWFFKIAALIGIMVGSFY 150
 IV ♂
IPGGYFSSVWFVVGMI GAALFILIQLVLLVDFAHSWNESWVNRMEEGNPR 200
 V ♂ VI
LWYAALLSFTSAFYILSIICVGLLYTYYTKPDGCTENKFFISINLILCVV 250
ASIISIHPKIQEHQPRSGLLQSSLITLYTMYLTWSAMSNEPDRSCNPNLM 300
 VII
SFITRITAPTLAPGNST [AVVPTPTPPSKSGSLLDSDNFIGLFVFLCLLY] 350
 ♂
SSIRTSTNSQVDKLTLSGSDSVILGDT]TSGASDEEDGQPRRAVDNEKEG 400
 VIII
VQYSYSLFHLMLCLASLYIMMTLTSWYSPDAKFQSM TSKWPAVWVKISS 450
 IX ♂
WVCLLLYVWTLVAPLVLT SRDFS 473

Figure 4, Bossolasco et al.

human	MGAVLGVFSLASWVPCLCSGASCLLCSCCPNSKNSTVTRLIYAFILLST	50
	::	
mouse	MGAVLGVFSLASWVPCLCSGASCLLCSCCPISKNSTVTRLIYAFILFLGT	50
human	VVSYIMQRKEMETYLKKIPGFCEGGFKIHEADINADKDCDVLVGKAVYR	100
	::	
mouse	IVSCIMMTEGIQTQLKKIPGFCEGGFQIKMVDTKAEKDCDVLVGFKAVYR	100
human	ISFAMAIFFFVFSLLMFKVKTSKDLRAAVHNGFWFFKIAALIGIMVGSFY	150
	::	
mouse	INFAVAIFFFFAFFLLMLKVKTSKDPRAAVHNGFWFFKIAAIIGIMIGSFY	150
human	IPGGYFSSVWFVVMIGAALFILIQLVLLVDFAHSWNESWVNRMEEGNPR	200
	::	
mouse	IPGGSFTEVWFVAGMLGASFFIIQLVLLVDMASWNELVVNRMEEGNPR	200
human	LWYAALLSFTSAFYILSIICGVLLYTYTTPDGCTENKFFISINLILCVV	250
	::	
mouse	LWYAALLSFTSLFYILSIVFAALLYVFYTKPDDCTENKVFIISNLIFCVA	250
human	ASIISIHPKIQEHQPRSGLLQSSLITLYTMYLTWSAMSNEPDRSCNPML	300
	::	
mouse	VSIVSILPKVQEHQPRSGLLQSSIITLYTLYLTWSAMTNEPERSCNPSLM	300
human	SFITRITAPTLAPGNSTAVVPTPTPPSKSGSLLDSDNFIGLFVFLCLLY	350
	::	
mouse	SIITHLTSPTVSPANSTTLAPAYRPPSQSGHFMNLDDIWGLIIFVFCLLY	350
human	SSIRTSTNSQVDKLTLSGSDSVILGDTTSGASDEEDGQPRRAVDNEKEG	400
	::	
mouse	SSFRTSSNSQVNKLTLSGSDSVILGDTT-NGANDEEDGQPRRAVDNEKEG	399
human	VQYSYSLFHLMLCLASLYIMMTLSWYSPDAKFQSMTSKWPAVWVKISSS	450
	::	
mouse	VQYSYSFFHLMLCCASLYIMMTITSWYSPDAKFQVSSKWLA VWFKMSS	449
human	WVCLLLYVWTLVAPLVLT SRDFS	473
	::::::::::::::::::::::::::::::::	
mouse	WLCLLLYLWTLVAPLVLTGRDFS	472

Figure 5, Bossolasco et al.

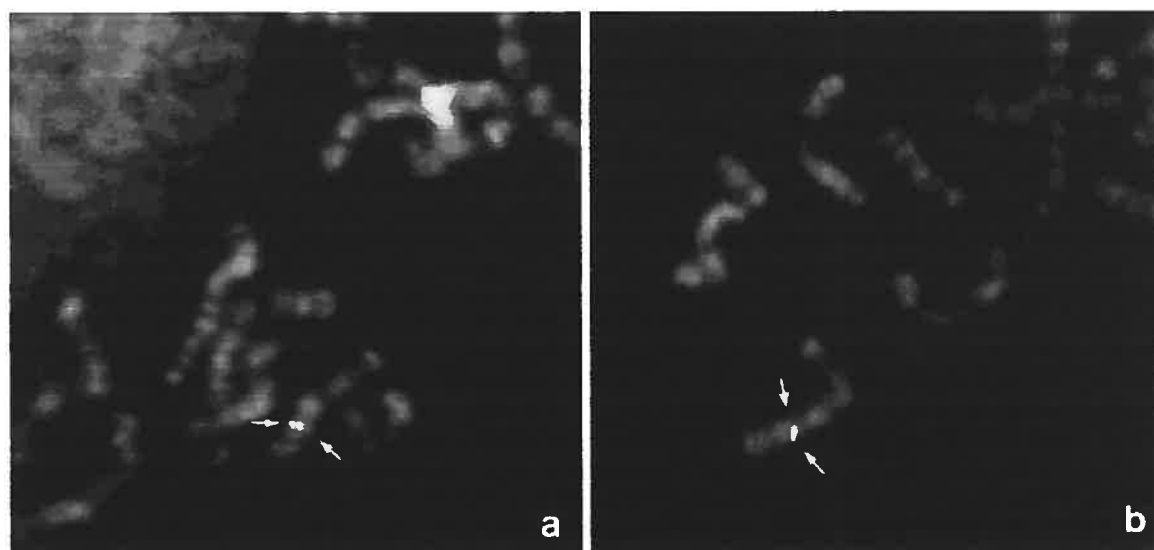
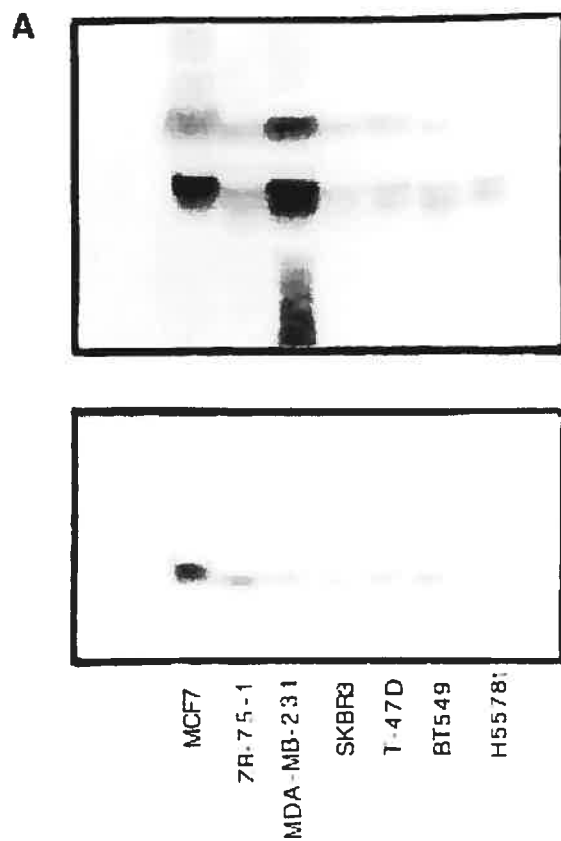


Figure 6, Bossolasco et al.



B

Northern blot analysis of HTDE expression in breast cancer cell lines

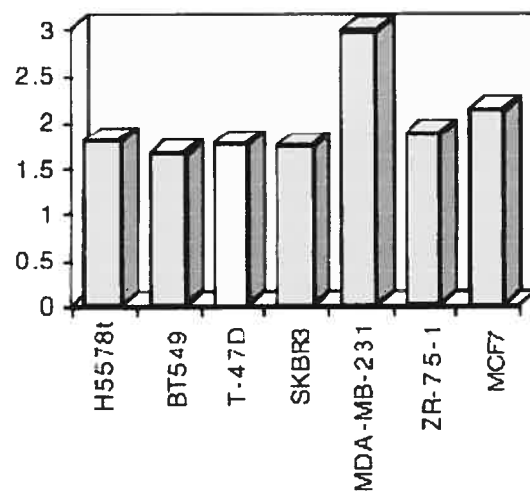


Figure 7, Bossolasco et al.

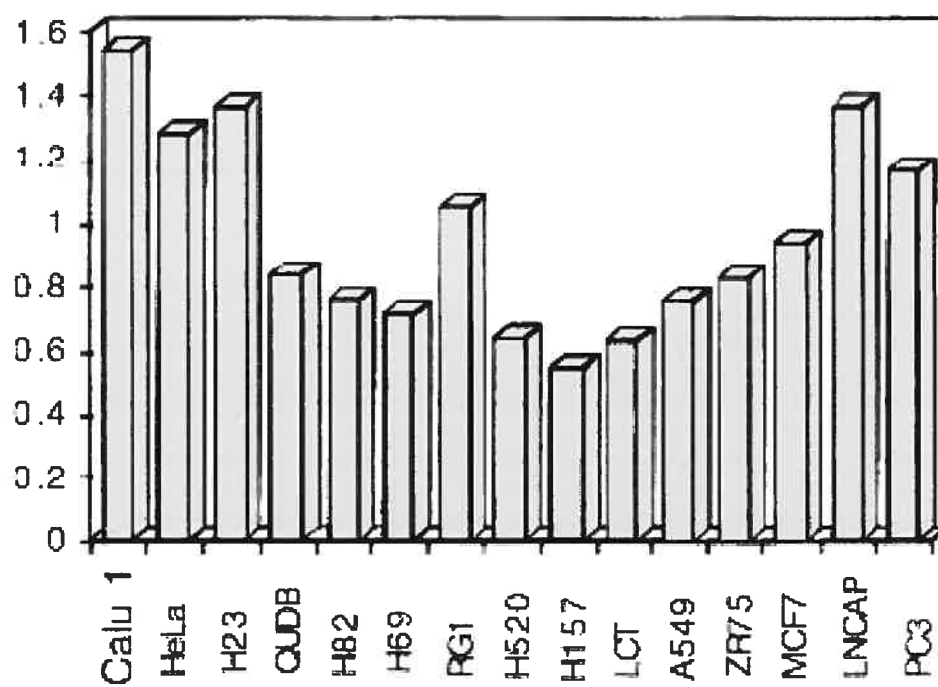
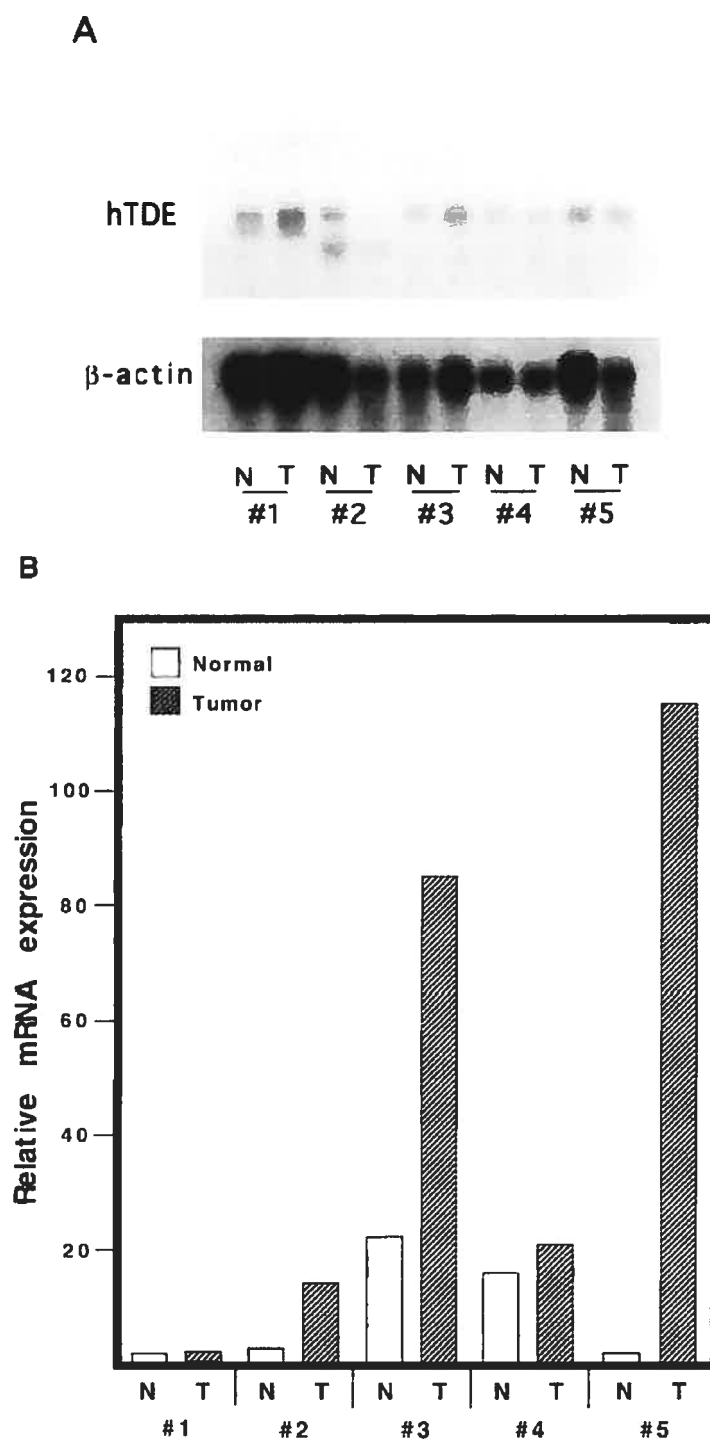


Figure 8, Bossolasco et al.



Article 2

Human TDE1, a TDE1/TMS family member, inhibits apoptosis *in vitro* and stimulates *in vivo* tumorigenesis.

Article soumis à la revue Oncogene

Short title: Oncogenic properties of hTDE1

ABSTRACT

We have previously described hTDE1, the human homologue of the recently described TDE1/TMS family of proteins whose members have been identified in several species. While a defined biochemical activity has yet to be assigned to TDE1/TMS family members, previous results point to the overexpression of family members in tumor cell lines or tissues. To define whether hTDE1 may directly impact on neoplastic transformation, we derived and characterized stable Rat-1 transfectants that constitutively express hTDE1 at the plasma membrane. Expression of *hTDE1* in Rat-1 cells does not appear to alter several *in vitro* characteristics such as the rate of cellular proliferation, the motility potential of cells as measured by a wound closure assay, and their invasiveness as determined by a matrigel based invasion assay. In contrast, we did note a significant effect on cell contact inhibition *in vitro* using a focus formation assay. In addition, by monitoring caspase-3 activity and Hoechst staining, we determined that *hTDE1* overexpression partially protects cells from serum starvation and etoposide induced apoptosis. Finally, *hTDE1* Rat-1 expressing clones accelerated the formation of tumors in a nude mouse assay. Our results suggest that hTDE1 contributes directly to oncogenesis *in vivo* that may in part be explained by its effect on apoptosis *in vitro*.

INTRODUCTION

Transgenic mice carrying the polyomavirus large T antigen (PyLT-Ag) under the control of the metallothionein promoter develop tumors after long latencies, suggesting that secondary events contribute to oncogenesis in these mice (Chalifour *et al.*, 1990; Chalifour *et al.*, 1992). Using this model system, we previously identified a novel gene, which we named *TDE1* (for Tumor Differentially Expressed) following a screen of differentially expressed genes in cell lines derived from pre- or post-adematous testes of transgenic mice (Lebel and Mes-Masson, 1994). This gene was also identified separately as *TMS-1* in a study on ESTs encoding hydrophobic proteins distributed in brain areas enriched in glutamatergic innervations (Grossman *et al.*, 2000). The same gene was also isolated through a novel method developed in order to screen for differentially expressed glycosylated molecules following hypoglossal nerve axotomy in mice, and was named *AIGP1* (Aoki *et al.*, 2002). In addition, we also cloned and characterized the human homologue of *TDE1* (*hTDE1*) from a human placental cDNA library (Bossolasco *et al.*, 1999). The identification of additional family members gave rise to the notion of a larger TDE1/TMS family of proteins (Grossman *et al.*, 2000; Krueger *et al.*, 1997), and members of this family have been identified in several species including *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Fugu rubripes*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*. The members of this family share between 30-80% homology, contain multiple hydrophobic domains and often include an N-terminal signal peptide. In mouse, at least five homologues have been identified, scattered over four different chromosomes while human TDE1/TMS genes have been found on five different chromosomes. (The Wellcome Trust Sanger Institute, Ensemble). When comparing the

sequence between human and mouse genes, it has been noted that most homologues between these two species locate on syntenic regions at the chromosome level suggesting evolutionary conservation (Table1). The conserved gene structure and protein sequence through evolution suggests an important biological role for TDE1/TMS family members.

While membership to the TDE1/TMS family is expanding, there is still no evidence for a precise biochemical function for these proteins. Several groups have conducted studies related to select family members. Mouse *TDE1* was originally described as being overexpressed in testicular tumors of transgenic mice and in cell lines derived thereof (Lebel and Mes-Masson, 1994). Interestingly, while tumor-derived transgenic cell lines generally overexpressed *TDE1*, this overexpression was more apparent *in vivo* in transgenic tissues. Similarly, we were able to detect high mRNA expression of *hTDE1* in lung cancer tissue samples as compared to normal lung tissues, although again the degree of overexpression was more marked in tumor tissues versus cell lines (Bossolasco *et al.*, 1999). Overexpression of *TMS-1/TDE1* was also noted in a small tumor that developed in the liver (Grossman *et al.*, 2000). While *TMS-1/TDE1* is generally ubiquitously expressed (Grossman *et al.*, 2000; Lebel and Mes-Masson, 1994), a second mouse family member, *TMS-2*, appears to localize in the mouse brain, and is more specifically associated with areas with glutamatergic excitatory neurons such as the hippocampus and cerebral cortex (Grossman *et al.*, 2000). Although the protein location might suggest a role in vesicular glutamate transport, *in vitro* experiments aimed at demonstrating a glutamate uptake into cells expressing transfected *TMS-2* were unsuccessful (Grossman *et al.*, 2000). It has separately been reported that *TMS-1/TDE1* (*AIGP1*) expression is increased in mouse cortical neurons after *in vivo* axotomy, a

model system to study nerve regeneration and death. (Aoki *et al.*, 2002). When *in vitro* cultured mouse neurons were subjected to several ER-Golgi stress conditions (brefeldin A and tunicamycin), this resulted in an increase in *AIGP1* expression. In transient transfection experiments, overexpression of *AIGP1* in COS-7 cells was followed by the induction of apoptosis, leading to the suggestion that the protein acts as a sensor protein for ER-Golgi stress in axotomized neurons which potentially accelerates programmed cell death following nerve injury (Aoki *et al.*, 2002). More recently, two new human members of the TDE1/TMS family have been cloned. One of them, *C5orf12* (Xu *et al.*, 2003), is the human homologue of the *TPO1* rat gene (Krueger *et al.*, 1997). Based on its pattern of expression, it has been postulated that *TPO1* is an essential component in the differentiation from proliferative prooligodendroblasts to postmitotic oligodendrocytes and that it plays a role in the rat myelin biogenesis (Krueger *et al.*, 1997). An analogous role in human brain has been suggested on the basis of sequence homology (Xu *et al.*, 2003). An additional human family member, *TDE2*, was identified by serial analysis of gene expression (SAGE) in non-small cell lung cancers (NSCLC) (Player *et al.*, 2003). *TDE2* was selected among several other differentially expressed genes because of its high level of differential expression when comparing lung tumors and primary lung epithelial cells. The authors performed *in situ* hybridization analysis as well as real time quantitative PCR on lung tumors and nonmalignant lung tissues. In both experiments, *TDE2* transcript expression was higher in NSCLC samples compared to expression levels in nonmalignant bronchiole epithelium.

Given that overexpression of TDE1/TMS family members has been associated with oncogenic transformation in mice (Grossman *et al.*, 2000; Lebel and Mes-Masson, 1994) and humans (Bossolasco *et al.*, 1999; Player *et al.*, 2003), we were interested in

directly accessing whether hTDE1 contributes directly to cell growth and transformation. Here we report on the stable expression of *hTDE1* in a Rat-1 cell model and the characterization of transfectants by several *in vitro* and *in vivo* assays associated with oncogenic transformation. We further describe the construction, expression and effect on aspects of transformation of two N-terminal and one C-terminal deletion mutants of hTDE1, in an attempt to identify functional regions of the protein.

RESULTS

Expression and sub-cellular localization of hTDE1 and its mutants

As previous attempts to generate a polyclonal antibody were unsuccessful, we generated a fusion protein, PGK-hTDE1- GFP, consisting of full-length *hTDE1* fused in frame just prior to the native stop codon with sequences encoding GFP, in order to localize the protein at the cellular level. Two N-terminal (NΔ17hTDE1 and NΔ126hTDE1) and one C-terminal (CΔ112hTDE1) deletion mutants of hTDE1 were similarly constructed and fused with GFP. The putative structure of hTDE1, as defined by Ensemble (The Wellcome Trust Sanger Institute), as well as the location of deletion mutants, is detailed in Figure 1A. NΔ17hTDE1-GFP removes the first 17 amino acids of the protein, corresponding to the major portion of a putative signal peptide sequence, possibly involved in targeting the protein to the plasma membrane. NΔ126hTDE1-GFP lacks 126 amino acids corresponding to the first 3 transmembrane segments and thus eliminates the first two protein loops. In CΔ112hTDE1-GFP, the last 112 amino acids were removed, resulting in a fusion lacking the last two protein loops of hTDE1 and

removes three serines and two threonines of twelve possible phosphorylation sites. Protein expression was determined by western blot analysis on transiently transfected Rat-1 cells, using the GFP antibody to detect fusion proteins. All constructs expressed a fusion protein corresponding to expected molecular sizes (~70, 65, 75, 63 kDa, Figure 1B).

To test biological function, stable clones were isolated from Rat-1 transfected cells expressing PGK-hTDE1, N Δ 17hTDE1, N Δ 126hTDE1, and CA112hTDE1. Northern blot analysis was used to confirm the expression of transfected sequences (Figure 1C). Clones expressing high levels of full-length *hTDE1* mRNA (PGK-hTDE1-24 and PGK-hTDE1-34) or mutants of *hTDE1*, including clones expressing the N Δ 17hTDE1 construct (N Δ 17hTDE1-15 and N Δ 17hTDE1-34), the N Δ 126hTDE1 construct (N Δ 126hTDE1-7 and N Δ 126hTDE1-11) and the CA112hTDE1 construct (CA112hTDE1-6, CA112hTDE1-8 and CA112hTDE1-24), were selected for further analysis. A stable mixed population of HEK-293 cells expressing full length hTDE1 was also generated (Figure 1D).

To verify the sub-cellular localization of full-length and mutant hTDE1 protein, cells (Rat-1, HEK-293 and A-549 cells) were transiently transfected with appropriate constructs. Cell localization was verified also in Rat-1 cells because subsequent functional analysis was performed on those cells. We therefore were interested in confirming the proper localization of our proteins in this type cell. Results in all cell types were comparable, and for clarity A-549 cells, which present a large cytoplasm, are presented (Figure 2). While the pEGFP-N1 vector localized evenly in the nucleus and the cytoplasm (Figure 2A), the full-length fusion protein PGK-hTDE1-GFP localized predominantly at the plasma membrane (Figure 2B), although some signal was apparent

at the perinuclear level. For the N Δ 17hTDE1-GFP fusion protein, while there was little signal at the plasma membrane, the majority of fluorescence appeared to concentrate in dot-like spots around the nucleus (Figure 2C), suggesting that the loss of the signal peptide affects the translocation of hTDE1 to the plasma membrane. Similar fluorescent results were obtained with the N Δ 126hTDE1-GFP fusion protein (data not shown). In contrast, the C-terminal mutant of hTDE1 was virtually indistinguishable from the full-length construct, with the majority of fluorescence localized to the plasma membrane (Figure 2D).

The effects of hTDE1 expression on various oncogenic parameters in vitro

A focus formation test was performed in order to determine if *hTDE1* expression alters the ability of normal Rat-1 cells to stop proliferating as they contact each other. (Figure 3A). PGK-hTDE1-34, N Δ 17hTDE1-15, and C Δ 112hTDE1-8 Rat-1 stable transfectants were left at confluence for 15 days. Full-length and C-terminal deletion *hTDE1* transfectants demonstrated clear loss of contact inhibition with the formation of robust foci. In contrast, the N-terminal deletion mutants (N Δ 17hTDE1-15), formed only sparse and minute foci.

By measuring cell proliferation, we investigated whether overexpression of *hTDE1* modifies the Rat-1 cell growth rate. Normal cells and transfected cells were grown in DMEM medium containing 10% serum. A colorimetric assay based on the cleavage of the tetrazolium salt WST-1 by mitochondrial dehydrogenases was used to quantify viable cells. WST-1 was added 24, 48, 72 or 96 hours after seeding. For comparative purposes, all values were normalized to the 24 hours reading which served

as the baseline. At 96 hours post-seeding (Figure 3B), using One-way Analysis of variance (ANOVA), we did not detect any significant difference in the growth rate between clones expressing either the full-length or mutant forms of *hTDE1* as compared to the parental Rat-1 cells. Similar results were obtained after 48 and 72 hours (data not shown).

To test whether *hTDE1* confers immortalizing properties, we transfected primary rat embryo fibroblasts (REF) with the construct able to direct the expression of full-length *hTDE1* (PGK-*hTDE1*-GFP), and transfection efficiency was monitored by fluorescence. Transfection of a recombinant plasmid directing the expression of the polyomavirus large-T antigen (Py-LT) served as a positive control (PGK-GFP-LT). Despite similar efficiencies of REF transfection as judged by fluorescence, a significantly smaller number of clones (n=23) could be derived following *hTDE1* transfection as compared to Py-LT (n=111) (Figure 4A). However, among those clones which could be derived, there was only a tendency towards a statistical significant difference (p=0.06) between immortalization results obtained with Py-LT and *hTDE1* (Figure 4B). These results suggest that any immortalizing activity of *hTDE1* would only be minimal.

Changes in cell motility as well as modifications in cell-to-cell adhesion processes were tested using an *in vitro* wound closure assay. Wound closure was assessed 24 hours after generating a physical scratch in monolayers from clones expressing full-length *hTDE1* (clones PGK-*hTDE1*-24 and PGK-*hTDE1*-34) and of parental Rat-1 cells as a control. As shown in Figure 5A, One-way Analysis of variance (ANOVA) revealed no significant differences, suggesting that the presence of *hTDE1* does not influence cell motility processes and cell-to-cell adhesion capacity.

In order to investigate whether the expression of *hTDE1* expression plays a role in cell invasion, we used a Matrigel Basement Membrane Matrix, shown to mimic the natural ECM, and compared the ability of different transfected and non-transfected cells to pass through the matrix. Using a One-way Analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's multiple comparisons test, a marked statistically significant difference ($p < 0.01$) was observed when comparing the parental Rat-1 cells with three independent clones expressing the C-terminal deletion of *hTDE1*, suggesting this region might be involved in regulation of cell invasion (Figure 5B). One N-terminal mutant (NΔ126*hTDE1*-7) showed a significant statistical difference ($p < 0.05$), while the remaining transfected clones, including two full-length *hTDE1* clones, were not statistically different from the parental line (Figure 5C).

We monitored the appearance of apoptotic cells using a Hoechst staining assay (Figure 6A). A significantly greater number of cells with condensed nuclei were observed in Rat-1 cells as compared to *hTDE1* expressing cells at 24 hours after both serum starvation (6.22% cells vs. 0.36% or 0.86%) and 40 μ M etoposide treatment (17.24% vs. 7.07% or 8.20%) (Figure 6C). Similarly, we tested caspase-3 activity, a major executor in the apoptotic signaling machinery, in cells grown in either complete media (control), medium with no FBS, or in complete medium containing 40 μ M etoposide. Rat-1 cells were compared to clones expressing full-length *hTDE1* (clone PGK-*hTDE1*-24 and clone PGK-*hTDE1*-34), and caspase-3 activity was monitored by cleavage of a fluorescent substrate. While a moderately lower caspase-3 activity was observed in *hTDE1* expressing clones at 24 hours (data not shown), a clear statistical difference was noted both in serum-starved and etoposide conditions between Rat-1 cells

and *hTDE1* expressing clones at 48 hours (Figure 6B). Internucleosomal DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis, was visualized by agarose gel electrophoresis. After etoposide treatment, control Rat-1 and HEK-293 cells, as well as clones PGK-*hTDE1*-24 and PGK-*hTDE1*-34 or HEK-293 cells expressing *hTDE1* displayed the typical DNA ladder associated with cells undergoing apoptosis (Figure 7A). Hypodiploid DNA, characteristic of cells in an advanced stage of apoptosis, was also measured by detecting the presence of a sub-G1 peak following flow cytometry analysis. The percentage of cells with hypodiploid DNA was higher in both Rat-1 and HEK-293 control cells when compared to clone PGK-*hTDE1*-24, clone PGK-*hTDE1*-34 or with a mixed population of HEK-293 cells expressing *hTDE1*. Results obtained with both Rat-1 and HEK-293 cells transfected with empty vector were similar to control cells (Figure 7B). Together, these results suggest that *hTDE1* expression protects cells from undergoing programmed cell death induced by either serum starvation or etoposide treatment.

The effects of *hTDE1* expression in vivo: nude mice xenograft assay

To determine the ability of *hTDE1* overexpressing cells to form tumors *in vivo*, we injected either Rat-1 cells or clones expressing full-length *hTDE1* (PGK-*hTDE1*-24 and PGK-*hTDE1*-34) subcutaneously in nude mice and monitored tumor formation (Figure 8). In order to verify if presence of the GFP fusion might impact on the protein function *in vivo*, we also injected a *hTDE1*-GFP fusion clone (PGK-*hTDE1*-GFP-16). Rat-1 cells, as well as control cells transfected with empty vector or control vector expressing GFP alone, either failed to form tumors or presented with small masses. In contrast, PGK-*hTDE1*-34 rapidly formed large tumors and the majority of mice had to

be sacrificed at ~50 days. Clones PGK-hTDE1-24 and PGK-hTDE1-GFP-16 also produced robust tumor formation, although with a longer latency.

DISCUSSION

The TDE1/TMS family includes several members, and different homologues have been identified in several species. Table 1 summarizes available data for the mouse and human family members. While a definitive biochemical function has yet to be defined for the family members, as a group they have been classified as transmembrane proteins. Cellular location and protein function are closely related. Indeed, aberrant sub-cellular localization of proteins is observed in cells of various diseases, such as in cancer, supporting the idea that cellular protein localization provides key information essentials to assign functions to known (Ferrigno and Silver, 1999) (Faust and Montenarh, 2000) (Pearce, 2000) and novel proteins (Simpson *et al.*, 2000). In the present report we have addressed the localization of hTDE1, the human homologue of this family. Our results, based on a GFP C-terminal fusion, clearly demonstrate the protein localized to the plasma membrane of the cell. In addition, it is also possible to visualize highly fluorescent dot-like structures in the perinuclear area of the cell. This latter fluorescence may be explained by hTDE1 overexpression resulting in large amounts of protein that may accumulate transiently during protein maturation. This accumulation may also generate improperly folded proteins and subsequently interfere with the ultimate membrane localization of the protein (Stevens and Argon, 1999). Alternatively, a large number of transmembrane proteins, including receptors, channels, and transporters, are known to cycle and in some cases this includes the presence of a

retention apparatus allowing membrane proteins to be stocked in vesicles outside the constitutive exocytotic pathway (Royle and Murrell-Lagnado, 2003). We also demonstrate that the N-terminal mutant of hTDE1, lacking the putative signal peptide, displays increased perinuclear signal with a concomitant loss in plasma membrane fluorescence. An accumulation in the RER-Golgi complex is characteristic of proteins in which N-terminal sequences involved in the translocation of protein to the plasma membrane are missing (Stevens and Argon, 1999) supporting an important role of N-terminal sequences in the final destination of mature protein. In contrast, the hTDE1 C-terminal mutant, similarly to the full-length protein, translocates to the plasma membrane, suggesting that these sequences are dispensable to proper protein sub-cellular localization.

Previous reports on mouse TMS-1, TMS-2 (Grossman *et al.*, 2000) and AIGP1 (Aoki *et al.*, 2002) have addressed their sub-cellular localization. Surprisingly, despite being homologues these proteins were localized to different compartments. As we have shown for *hTDE1*, an HA C-terminal epitope-tagged construct of *TMS-1* transiently expressed in HEK 293 cells, also localized to the plasma membrane (Grossman *et al.*, 2000). Contrasting with those results, AIGP1 was predominantly localized to the Golgi complex based on immunofluorescence staining of cultured cortical neurons using a AIGP1 specific antibody. The Golgi localization was further confirmed in COS-7 transfected cells expressing N-terminal FLAG-tagged AIGP1 (Aoki *et al.*, 2002).

Previous reports, including ours, suggest that aberrant expression of TDE1/TMS family members may be involved in the process of cellular transformation (Bossolasco *et al.*, 1999; Grossman *et al.*, 2000; Lebel and Mes-Masson, 1994; Player *et al.*, 2003). In this report, we have directly assessed the transforming properties of hTDE1 following

stable transfection in the Rat-1 cell line. Comparing parental and hTDE-1 Rat-1 cells, we analyzed both *in vitro* and *in vivo* characteristics associated with oncogenic cell transformation. While full length *hTDE1* expression appeared to have little effect on assays that measure cellular migration, invasion, immortalization and proliferation, we did observe a clear effect of *hTDE1* expression on assays measuring response to apoptotic stimuli, contact inhibition and tumor formation in nude mice. A C-terminal mutant, lacking the last 112 amino acids alters normal cells ability to cross a Matrigel matrix, suggesting this region might be involved in cell invasion.

The fact that *hTDE1* affects some, but not all, of the parameters associated with cell transformation is perhaps not surprising as this phenomenon has been observed for a number of viral and cellular oncogenes (Renan, 1993). Migration involves cell locomotion while invasion require the further ability to pass through an obstructive physical barrier (Mareel and Leroy, 2003). The *in vitro* wound closure assay (Ronot *et al.*, 2000; Shigeta *et al.*, 2003) might reflect either a change in cell migration or a modification in intracellular adhesiveness. When comparing Rat-1 cell wound closure with that induced by clone PGK-hTDE1-24 and PGK-hTDE1-34, we failed to detect any significant impact, suggesting that *hTDE1* is not involved in cell motility or cell-to-cell adhesion. The Matrigel matrix used to assess cellular invasiveness again provided no differences between Rat-1 cells and clones PGK-hTDE1-24 and PGK-hTDE1-34. Perhaps surprisingly, C-terminal mutants of hTDE1 were significantly less able to cross the Matrigel matrix than the full-length hTDE1 expressing cells and normal Rat-1 cells. As C-terminal mutants still localize to the plasma membrane, it is tempting to speculate that their negative impact on passage through Matrigel is related to their ability to inhibit endogenous signals promoting cell migration, adhesiveness and/or invasion.

In order to address the effect of *hTDE1* on senescence, the *in vitro* immortalizing activity of *hTDE1* was compared to that of Py-LT, a protein known to exhibit immortalizing properties (Rassoulzadegan *et al.*, 1983). Due to the limited number of *hTDE1* expressing REFs, the frequency of immortalization (1/23) associated with *hTDE1* expression is not significantly different from the spontaneous rate of immortalization reported earlier for REFs (Pilon and Mes-Masson, 1996). While we cannot totally exclude an immortalizing potential, this activity would be marginal in comparison to an oncogene such as Py-LT.

Compared to the Rat-1 parental cell lines, expression of either the full-length *hTDE1*, or N- and C-terminal deletion mutants of *hTDE1*, had no appreciable effect on proliferation rates as measured by a WST-1 assay. It has been suggested that the unrestrained increases in the number of tumor cells is not only due to an increase in cellular proliferation due to an accelerated or uncontrolled cell cycle, but may more closely be linked to an imbalance between the number of dividing cells and the number of cells progressing to terminal differentiation or death (Corn and El-Deiry, 2002; Green and Evan, 2002; Nowell, 2002). Indeed, we assessed the ability of *hTDE1* to impact on apoptosis, both in response to serum starvation and etoposide exposure. In both case, the number of *hTDE1*-expressing cells undergoing apoptosis were significantly reduced compared to the parental Rat-1 cells, and this was accompanied by a significant decrease in caspase-3 activation in the *hTDE1* expressing clones. Cellular death was also measured by sub-G1 peak detection through flow cytometry and apoptosis was confirmed through visualization of a characteristic DNA ladder on agarose gel. Results obtained from Rat-1 cells were comparable to those we observed in HEK-293 cells, suggesting that *hTDE1* impact on apoptosis was not dependent on the cells type used for

the analysis. These results are in stark contrast to those associated with the effect of *AIGP1* on apoptosis, where this *TDE* homologue was found to promote apoptosis in axotomized mice neurons (Aoki *et al.*, 2002). In addition, induction of apoptosis was also observed following transient transfecting of COS 7 cells with *AIGP1* (Aoki *et al.*, 2002). Differences between the effect of *AIGP1* and *hTDE1* may be explained by differences at the protein level (the proteins share 77% homology) or differences in the model systems used to test apoptosis, including the observation that *AIGP1* induces apoptosis following transfection while in this report stable clones were tested for their ability to resist specific inducers of apoptosis. Differences related to protein sequence and function are supported by the observation that the apoptotic rate was unchanged following transfection of COS-7 cells with *TPO1*, a rat TDE1/TMS family member (Aoki *et al.*, 2002). Finally, a fundamental difference was also noted in sub-cellular localization of these family members, with *AIGP1* localized at the Golgi and *hTDE1* at the plasma membrane, which may in part account for the different activities observed of these proteins. Nonetheless, our results support an anti-apoptotic function for *hTDE1* that would impact positively on cellular transformation.

Loss of density-dependent inhibition and contact inhibition results in the formation of disordered, multilayer array of cells that are observed as foci growing on a cellular monolayer (Temin and Rubin, 1958). In contrast to the parental line which fails to form foci at confluence, clones PGK-*hTDE1*-24 and PGK-*hTDE1*-34 form robust foci. In contrast, N-terminal mutant clones, which are unable to properly locate to the plasma membrane, were rarely able to form foci. Several membrane molecules that are part of adhesion junctions, including cadherins, are thought to play a role in density dependent contact inhibition (Grazia Lampugnani *et al.*, 2003) (Bazzoni and Dejana,

2004). Although no sequence homology have been identified with other membrane proteins, because hTDE1 localizes at the plasma membrane and modifies cellular response to density dependent contact inhibition, hTDE1 may similarly impact on adhesion. C-terminal mutant clones were also able to form foci, and these were generally more compact than those observed with full-length *hTDE1*, suggesting that this region might be involved in regulating cell-to-cell contact. Coupled with these results the observation that these mutants are less able to invade and migrate through a Matrigel matrix, hint at the possibility that hTDE1 affects cell adhesion to a matrix. How and whether hTDE1 proteins are involved in cell-to-cell and cell-to-substratum adhesion and migration is unclear and warrants further investigation.

The ultimate characteristic of the oncogenic cell is its ability to form tumors in an *in vivo* environment. Therefore, the most striking observation in this report is the ability of PGK-hTDE1-34 and PGK-hTDE1-24 cells to form tumors in a nude mouse xenograft assay. Indeed, tumor formation in the PGK-hTDE1-34 injected mice is so robust that the majority of mice (4/6) had to be euthanized at day 50 because of the large tumor size. Control mice either failed to develop tumors or developed minute masses at the site of injection. Mice injected with clone PGK-hTDE1-24 and clone PGK-hTDE1-GFP-16 cells were also able to consistently form tumors, although the latency was somewhat longer. Although tested only with one clone, this result suggests that the addition of the GFP moiety at the C-terminal end of the protein does not significantly impact on its tumorigenic potential.

In conclusion, while we have as yet to assign a precise biochemical function to TDE1/TMS family members, the results presented here, coupled to our previous results in tumor bearing transgenic mice and the demonstration that *hTDE1* overexpression can

be observed in tumor tissues (Bossolasco *et al.*, 1999), strongly support a role for hTDE1 in the oncogenic process. The present study also underlies the ability of hTDE1 to interfere with programmed cell death, allowing cells to escape control mechanisms established in multicellular organisms to eliminate malfunctioning cells such as transformed cells. The identification of cellular proteins able to interact with TDE1/TMS family members would without doubt contribute to a better understanding of hTDE1 function and allow us to better understand how these proteins impact on transformation.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

The *hTDE1* full-length sequence was amplified from a placental cDNA library plasmid (Bossolasco *et al.*, 1999) using the 5' sense primer 5'-CACGAGCTCAGCTGGCAGTTA-3' and the 3' antisense primer 5'-CCGGATCCCACCTGAACTCCCGAC-3' thus eliminating the *hTDE1* stop codon. The 1495 bp PCR product and the pEGFP-N1 vector (Clontech, Palo Alto, CA) were digested with *SacI* and *BamHI* and ligated to generate the intermediate cloning vector hTDE1-GFP. The *hTDE1* sequences were extracted from hTDE1-GFP using *XhoI/BamHI* and re-cloned within the *XhoI/BamHI* site of a PGK-GFP-hygro vector (Rodier *et al.*, submitted) giving rise to PGK-hTDE1-GFP where hTDE1 is fused in-frame at its C-terminus with green fluorescent protein (GFP). PGK-hTDE1-GFP is selectable in hygromycin and the hTDE1-GFP sequence is under the control of the Phospho Glycerate Kinase promoter. PGK-GFP-hygro was also digested with *BsrGI* within GFP sequences, blunt-ended with Klenow fragment, and digested with *SacI*. This

product was ligated to the *SacI/SspI* hTDE1 fragment (Bossolasco *et al.*, 1999) giving rise to PGK-hTDE1 which directs the expression of full-length protein not fused to GFP sequences.

N-and C-terminal deletions mutants were generated. Following intermediate steps that allowed the introduction of 5'cloning sites associated with a start codon, NΔ17hTDE1-GFP was generated. This plasmid is similar to PGK-hTDE1-GFP except for the deletion of the first 17 amino acids of hTDE1. A similar strategy was used to clone NΔ126hTDE1-GFP where the first 126 amino acids of hTDE1 were deleted. Introduction of stop codon between TDE1-GFP sequences also allowed the generation of NΔ17hTDE1 and NΔ126hTDE1 in which hTDE1 N-terminal mutants are expressed without fusion to GFP. Following intermediate steps that allowed the removal of the last 112 amino acids of hTDE1, the plasmid CΔ112hTDE1-GFP was generated in the *XhoI/BamHI* backbone of the PGK-GFP-hygro vector that allows the expression of a fused C-terminal deletion mutant of hTDE1 with GFP. Introduction of a stop codon between the *hTDE1* and GFP sequences allowed the generation of CΔ112hTDE1 in which the C-terminal deletion of hTDE1 is expressed without associated GFP sequences.

For cloning experiments restriction and modifying enzymes were purchased from New England Biolabs (NEB, Beverly, MA) and final constructs were sequence verified.

Cell culture and transfection

All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent, Quebec, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent), 50

$\mu\text{g/ml}$ gentamycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) and $2.5 \mu\text{g/ml}$ amphotericin B (Wisent). Cells were maintained at 37°C under an atmosphere of $5\% \text{CO}_2$. For transfection experiments, Rat-1, HEK-293 and A-549 cells were transfected using Lipofectamine (Invitrogen). Cells were grown in 100 mm dishes and transfected at 80% confluence with $10 \mu\text{g}$ of plasmid, $20 \mu\text{l}$ of lipofectamine and $30 \mu\text{l}$ of ReagentPlus, according to manufacturer's protocol. For Rat-1 stable transfections, cells were passed at a 1:3 dilution 24 hours after transfection and maintained in medium containing $75 \mu\text{g/ml}$ hygromycin B (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). For HEK-293 stable transfections, cells were maintained in medium containing $75 \mu\text{g/ml}$ hygromycin B (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) for several months resulting in a mixed population of cells expressing hTDE1.

Western blots analysis

Cells were scraped, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 100 mM dithiothreitol (DTT), 10% glycerol) and sonicated for 30 seconds (Scientific Instruments, KS212 model, Ringoes, NJ). Sonication was followed by 10 minutes centrifugation at 13000 rpm at 4°C . Supernatant containing the proteins was transferred to another tube and protein concentration was determined with the Bradford method. From 20 to $50 \mu\text{g}$ of proteins were loaded on a 9% SDS-PAGE acrylamide gel. After migration, proteins were subsequently electrotransferred on a nitrocellulose membrane for one hour at 4°C at 200mA. (Bio-Rad Trans-Blot Cell, Hercules, CA). For protein detection, membranes were blocked overnight with PBS containing 5% skin milk, 0.1% Tween 20. Primary antibodies for GFP (JL-8, Clontech) or β -actin (AC-14, Abcam,

Cambridge, UK) detection were diluted 1:8000 and 1:10000 respectively, in PBS containing 5% skin milk, 0.1% Tween 20 buffer. Membranes were incubated for 45 minutes with the β -actin primary antibody, or for 3 hours with the GFP primary antibody and were subsequently washed with PBS containing 2% Tween 20. Secondary antibody consisting of anti-mouse IgG-HRP conjugated (Santa Cruz Antibodies, Santa Cruz, CA) was used at a 1:12000 dilution rate. The ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) kit was used to detect the signal on the membranes.

RNA Purification, Northern blots Analysis and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (PCR).

RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY). Purified RNA was quantified spectrophotometrically, and the quality was determined by ethidium bromide staining after agarose electrophoresis. For each sample, 20 μ g of total RNA was electrophoresed through a 1% agarose gel containing 0.36 M formaldehyde. Transfer was performed on a GeneScreen Plus hybridization transfer membrane (NEN Life Science Products, Boston, MA). The gel was washed two times in 0.05 M NaOH in 1X SSC for two 10 minute periods, then soaked in 10X SSC for two 20 minute periods. Capillary transfer was performed overnight in 10X SSC. The membrane was UV-crosslinked (UV-Stratalinker 2400, Stratagene, Cedar Creek, TX) and hybridized overnight at 64°C, in 1% SDS, 1 M NaCl and 10% Dextran sulfate supplemented with 100 μ g/ml of salmon sperm DNA and labeled probe. All probes were labeled overnight at room temperature using a random primer labeling system (RedprimeTM II, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). A probe corresponding to the mouse β -actin RNA

was used as internal control. After overnight hybridization, membranes were rinsed twice for 30 minutes with 2X SSC, 0.1 %SDS. Membranes were exposed to Kodak BioMax MS films with an intensifying screen at -80°C overnight.

Five μg of total RNA were converted to single-stranded cDNA by using murine reverse transcriptase in a volume of 30 μl containing 6 μl of 5X first strand buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), 10 mM DTT, 0.6 mM dNTPs, 33 U of RNase guard, 0.5 μg of oligodT primers and 400 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The reaction was performed at 42°C for 60 minutes. For the subsequent PCR reaction, 5 μl of the cDNA reaction product was amplified by using 5'-GGGGCTGTGCTGGGTGTCTT-3' for the 5' sense primer and 5'-CGGATCCGTGTCCTTGGCACTCAGAGGT-3' for the 3' antisense primer. Amplification of the β -actin as a positive control was performed using 5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3' for the 5' sense primer and 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3' for the 3' antisense primer. PCR reaction was performed in a final 50 μl containing 5 μl of 10X PCR buffer, 2 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 0.2 μM of sense and antisense primers and 2 U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche, Applied Science, Basel, Switzerland). PCR was performed for 25 cycles at 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute.

Foci formation assay

Cells were seeded in 100 mm Petri dishes (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany) grown to confluence and re-fed fresh media twice a week. Confluence was maintained for 15 days, following which cells were washed with PBS, rinsed in 50% methanol/ 50%

PBS and subsequently incubated for 10 minutes in fresh anhydrous methanol. Cells were stained with Giemsa diluted 1:5 in deionized water; (VWR Scientific Products, West Chester PA), and incubated overnight. In the morning, dye was removed and Petri dishes were rinsed with deionized water, dried, photographed and focus formation was scored.

Cell proliferation assay

To assess cell proliferation, 4×10^3 cells were seeded in a final volume of 100 μ l/well in 96 wells flat bottom microplates (Corning, NY). Cells were grown with 10% serum, and 10 μ l of Cell Proliferation reagent WST-1 (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) was added to cells after 24, 48, 72 or 96 hours after seeding. After one-hour incubation with WST-1, absorbance of samples was measured on a microplate reader at 450 nm with the reference wavelength set at 650 nm (Bio-Rad Model 3550). The 24 hours readings served as the comparison for the 48, 72 and 96 hours time points.

Immortalization assay

Primary Rat Embryo Fibroblasts (REFs) were isolated from minced 16 day Fisher rat embryos (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA) once heads and livers were removed. Minced tissues were placed in DMEM culture medium containing 200 U of crude collagenase and incubated at 37°C for 1 hour. Cells were dispersed and seeded in complete media at 3×10^5 cells per 60 mm dish and incubated overnight. REFs were transfected with either the PGK-GFP-Hygro vector alone or with the PGK-hTDE1-GFP construct. The PGK-GFP-LT expressing the polyomavirus large T antigen (Rodier et al, submitted) was used as a positive control. After 24 hours, transfected cells were

passed 1:3 and selected in DMEM medium supplemented with 35 μ M hygromycin B (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Selection was maintained for 2-3 weeks after which 20 to 100 clones were picked. Clones that could be passed at a 1:5 dilution in 100 mm Petri dishes at least five times were scored as immortal (Pilon and Mes-Masson, 1996).

Wound closure assay

Cells were seeded on 35 x 10 mm tissue culture dish with grid (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and grown to confluence. Monolayers were scratched using the edge of a cell scarper (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and wound regions were marked and photographed. Plates were incubated at 37°C for 24 hours and wound sites were re-photographed. Wound closure was calculated by comparing the area over which cells were able to invade the wound surface after 24 hours. Areas were measured using ImageJ software (ImageJ 1.30v, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

Matrigel invasion assay

Matrigel Matrix (Becton Dickinson, Palo Alto, CA) was stored -20°C at a concentration of 10 mg/ml (in phenol red-free DMEM with 10 μ g/ml of gentamycin) and allowed to stand at 4°C overnight before use. Matrigel was diluted in DMEM medium alone at a concentration of 1 mg/ml and 20 μ l were placed at the bottom of inserts with polyethylene terephthalate (PET) track-etched membranes (Falcon, Becton Dickinson, Palo Alto, CA) and incubated at 37°C for 4 hours to solidify. At seeding, 500 μ l/well of medium supplemented with 5% FBS was added to the bottom of the 24 wells

plate (Falcon, Becton Dickinson Labware). The inserts were placed inside the wells and 3×10^4 cells were seeded on top of individual matrigel-coated inserts. The 24 wells plate was incubated at 37°C for 24 hours, after which medium was poured off, and the matrigel was removed by scrapping with a cotton swab. Inserts were washed with 1 X PBS, rinsed in 50% methanol / 50% PBS, incubated for 10 minutes in fresh anhydrous methanol, dried for one hour. Cells were subsequently stained with Giemsa, and incubated overnight, after which inserts were rinsed with deionized water, dried and stained cells were counted under the microscope (Nikon eclipse TE300, Nikon, Tokyo, Japan). To perform parametric statistical analysis (ANOVA), raw values were rescaled to \log_{10} .

Hoechst staining

Cells (3×10^4) were seeded on microscope glass coverslips (n°12, Fisherbrand, Fisher Scientific, Leicestershire, UK) in 24 wells plates (Falcon, Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Cells were allowed to settle for 24 hours. Apoptosis was then induced by replacing medium with either serum-free media or by media supplemented with $40 \mu\text{M}$ etoposide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Following 24 and 48 hours treatments, $1 \mu\text{l}$ of a 10 mg/ml Hoechst stain solution (Bisbenzimidazole H33258, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added to each well. Cells were incubated at 37°C for 1 hour. Microscope coverslips were then removed and placed on microscope slides (Corning glass Works, Corning, NY). Five fields per coverslip were examined under a fluorescent microscope (excitation wavelength 365 nm , emission wavelength 465 nm , 40×0.60 magnification,

NIKON eclipse TE300, Tokyo, Japan) and the percentage of apoptotic cells was determined counting nuclei with condensed and fragmented chromatin.

Caspase-3 activation assay

Caspase-3 activity was measured using the Ac-DEVD-AFC substrate and assayed according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were seeded at 70% confluence. After 24 hours, apoptosis was induced by replacing media with either serum-free media, or complete media supplemented with 40 μ M etoposide. Both adherent and floating cells were harvested at 24 and 48 hours post-treatment, placed in a 15 ml tube and pelleted at 1 500 rpm for 10 minutes. Pellets were resuspended in cold PBS, transferred to Eppendorf tubes and re-pelleted at 1 500 rpm for 10 minutes. Supernatants were discarded, and pellets were suspended in 70 μ l of lysis buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were placed on ice for 10 minutes, debris were pelleted and supernatants were stored at -80°C . Protein concentration was measured at 579 nm by the BCA protein quantification kit (Pierce, Rockford, IL). For each assay, 35-50 μ g of proteins were incubated for 30 min with 50 μ M of Ac-DEVD-AFC at 30°C . The detection of fluorescence upon cleavage of the substrate was analyzed using a FluoStar-Optima microplate reader (BMG lab Technologies, Offenburg, Germany) in fluorescence mode using an excitation filter of 380 nm (10 nm bandpass) and an emission filter of 505 nm (10 nm bandpass). The reaction was allowed to proceed for 30 minutes with a reading every minute. Caspase-3 activities were obtained by calculating the slope of the reaction over 30 minutes for each assay.

DNA ladder assay

Cells were seeded at 70% confluence. After 24 hours, apoptosis was induced by replacing media with complete media supplemented with etoposide. A final concentration of 40 μ M etoposide was used on Rat-1 control and transfected cells while a 10 μ M etoposide final concentration was used on HEK-293 control and transfected cells. Both adherent and floating cells were harvested at 24 and 48 hours post-treatment, placed in a 15 ml tube and pelleted at 1500 rpm for 15 minutes. Pellets were resuspended in 1 ml final volume of 1 M Tris-HCl pH8, 0.5 M EDTA pH 8 and 10% SDS containing 100 μ g/ml of Proteinase K (Fermentas, Burlington, Canada) and samples were incubated at 37°C with shaking overnight. The day after, samples were chilled on ice for 10 minutes. A 400 μ l volume of 5 M NaCl was added and tubes were inverted several times to mix. Samples were spun for 15 minutes at 3400 rpm. Supernatant was transferred to a new tube and DNA was precipitated by adding 2 volumes of 100% ethanol. The pellet was resuspended in 20 μ l of water and incubated at 37°C for 30 min with RNase A (usb, Cleveland, USA) at a final concentration of 20 μ g/ml. Electrophoresis was performed in 1.6% agarose gel in TBE buffer, after which DNA was visualized by ethidium bromide staining. DNA fragmentation analysis was assessed by resolving 10 to 20 μ g of DNA for each sample.

Determination of hypodiploid DNA content

To measure the loss of DNA due to cell death, cells were seeded at 70% confluence. After 24 hours, apoptosis was induced by replacing media with complete media supplemented with etoposide. A final concentration of 40 μ M etoposide was used

on Rat-1 control and transfected cells while a 10 μ M etoposide final concentration was used on HEK-293 control and transfected cells. Both adherent and floating cells were harvested at 24, 48 and 72 hours post-treatment, placed in a 15 ml tube and pelleted at 1500 rpm for 15 minutes. Cells were fixed by resuspending pellets in ice-cold 70% ethanol for 1 hour. One hour before performing flow cytometry analysis, ethanol fixed cells were washed twice with PBS. Cells were then resuspended in PBS containing 0.5mg/mL RNase A (usb, Cleveland, USA) and 40 μ g/mL Propidium Iodine (molecular probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) and incubated at room temperature for 30 minutes. Samples were analyzed using a Becton Dickinson Fac Scan Flow Cytometer (Becton Dickinson, California) as described by Ormerod et al. (1992). Cells with sub-G1 (hypodiploid DNA) Propidium Iodine incorporation were considered apoptotic.

Tumorigenesis assay

Four to seven weeks old CD1 Br Nu/Nu mice (Charles Rivers, St-Constant Qc) were used for tumor growth xenograft experiments. Stable clones expressing PGK-GFP (empty vector), PGK-hTDE1-GFP and PGK-hTDE1 were tested. Rat-1 (non-transfected) cells and PBS alone were also used as negative controls. Mouse flanks were injected subcutaneously with 2.5×10^6 cells for each clone, (6 mice per clone) and tumor size was measured every two weeks for four months. Mice were sacrifice early when tumor volumes reached $> 2\text{cm}^3$.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the InStat3 GraphPad Software (GraphPad Software, Inc, (c) 1990-2001).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jason Madore for technical assistance, Wissal El-Assaad and Abdellah Belmaaza for stimulating discussions. This research was funded in part by a Canadian Institute of Health Research (CIHR) grant and a Cancer Research Society grant to A.-M.M.-M. M.B. has been supported by an CIHR studentship as well as awards from the Canderel and Marc-Bourgie funds of the Institut du cancer de Montréal. F.V. was the recipient of a Canderel studentship award. A.-M.M.-M. is the recipient of a Fonds de la recherche en santé au Québec (FRSQ) Chercheur National Fellowship, R.B. is the recipient of an FRSQ Senior Fellowship.

REFERENCES

- Aoki S, Su Q, Li H, Nishikawa K, Ayukawa K, Hara Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H and Wada K. (2002). *J Neurosci*, **22**, 10751-60.
- Bazzoni G and Dejana E. (2004). *Physiol Rev*, **84**, 869-901.
- Bossolasco M, Lebel M, Lemieux N and Mes-Masson AM. (1999). *Mol Carcinog*, **26**, 189-200.
- Chalifour LE, Gomes ML, Wang NS and Mes-Masson AM. (1990). *Oncogene*, **5**, 1719-26.
- Chalifour LE, Mes-Masson AM, Gomes ML and Wang NS. (1992). *Molecular Carcinogenesis*, **5**, 178-89.
- Corn PG and El-Deiry WS. (2002). *Bioessays*, **24**, 83-90.
- Faust M and Montenarh M. (2000). *Cell Tissue Res*, **301**, 329-40.
- Ferrigno P and Silver PA. (1999). *Methods Cell Biol*, **58**, 107-22.
- Grazia Lampugnani M, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F, Orsenigo F, Cattelino A, Kemler R, Daniel TO and Dejana E. (2003). *J Cell Biol*, **161**, 793-804.
- Ormerod, MG et al. (1992). *J. Immunol. Methods*, **153**, 57-65
- Green DR and Evan GI. (2002). *Cancer Cell*, **1**, 19-30.
- Grossman TR, Luque JM and Nelson N. (2000). *J Exp Biol*, **203 Pt 3**, 447-57.
- Krueger WH, Gonye GE, Madison DL, Murray KE, Kumar M, Spoerel N and Pfeiffer SE. (1997). *J Neurochem*, **69**, 1343-55.
- Lebel M and Mes-Masson AM. (1994). *DNA Sequence*, **5**, 31-9.
- Mareel M and Leroy A. (2003). *Physiol Rev*, **83**, 337-76.

- Nowell PC. (2002). *Semin Cancer Biol*, **12**, 261-6.
- Pearce DA. (2000). *J Neurosci Res*, **59**, 19-23.
- Pilon AA and Mes-Masson AM. (1996). *Virus Res*, **46**, 171-5.
- Player A, Gillespie J, Fujii T, Fukuoka J, Dracheva T, Meerzaman D, Hong KM, Curran J, Attoh G, Travis W and Jen J. (2003). *Int J Cancer*, **107**, 238-43.
- Rassoulzadegan M, Naghashfar Z, Cowie A, Carr A, Grisoni M, Kamen R and Cuzin F. (1983). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 4354-8.
- Renan MJ. (1993). *Mol Carcinog*, **7**, 139-46.
- Ronot X, Doisy A and Tracqui P. (2000). *Cytometry*, **41**, 19-30.
- Royle SJ and Murrell-Lagnado RD. (2003). *Bioessays*, **25**, 39-46.
- Shigeta M, Sanzen N, Ozawa M, Gu J, Hasegawa H and Sekiguchi K. (2003). *J Cell Biol*, **163**, 165-76.
- Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R and Wiemann S. (2000). *EMBO Rep*, **1**, 287-92.
- Stevens FJ and Argon Y. (1999). *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 443-54.
- Tatusova, TA, and Madden, TL. (1999) *FEMS Microbiol Lett*, **174**, 247-250.
- Temin HM and Rubin H. (1958). *Virology*, **6**, 669-88.
- Xu J, Ji C, Wang L, Cao Y, Dai J, Ye X, Zeng L, Wu Q, Xie Y and Mao Y. (2003). *Mol Biol Rep*, **30**, 47-52.
- Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil, editors.
- Hamilton (Canada): BC Decker Inc; c2003.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hypothetical structure of hTDE1 protein and Western and Northern blot analysis. (A) Roman numbers identify transmembrane segments of the protein. Arrows identify the approximate location of the deletion mutants NΔ17hTDE1 (1), NΔ126hTDE1 (2) and CΔ112hTDE1 (3). (B) Western blot analysis. Proteins extracts were from transiently transfected Rat-1 cells expressing PGK-hTDE1-GFP, NΔ17hTDE1-GFP, NΔ126hTDE1-GFP, and CΔ112hTDE1-GFP. GFP antibody was used to detect fusion proteins. Although expression levels of the CΔ112hTDE1-GFP are low, the fusion protein migrates at the expected molecular size. (C) Northern blot analysis. RNA was purified from isolated Rat-1 independent clones transfected with either full-length or mutant hTDE1 not in fusion with GFP. hTDE1 sequences were revealed using a DNA probe corresponding to a 710 bp digestion fragment (*BglIII/AccI*). Mouse β-actin mRNA was used as a loading control. (D) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis of control and hTDE1 transfected HEK-293 cells. RNA was purified from HEK-293 cells and from a mixed population of HEK-cells expressing full-length hTDE1. Following cDNA generation, expression was examined by semi-quantitative PCR using β-actin and hTDE1 specific primers (see Materials and Methods). 20 μl of the RT-PCR product was resolved on a 1% TBE agarose gel.

Figure 2. Sub-cellular localization of hTDE1. Fluorescence in A 549 cells transiently transfected with: (A) pEGFP-N1 vector expressing the green fluorescent protein; (B)

PGK-hTDE1-GFP vector expressing full-length hTDE1-GFP; (C) N Δ 17hTDE1-GFP; and (D) C Δ 112hTDE1-GFP.

Figure 3. Foci formation and cell proliferation assay. (A) Focus formation assay. The ability of Rat-1 cell, or stable Rat-1 transfected clones PGK-hTDE1-34, N Δ 17hTDE1-15, and C Δ 112hTDE1-8 to form foci was evaluated 15 days post-confluence. Note that both the full-length and the C-terminal deletion mutant of hTDE1 are able to form foci, and that those formed by the C-terminal deletion appear highly compact. (B) Cell proliferation assay. Histogram represents the growth rate of control (Rat-1) and stable transfectants expressing either the full-length or deletion mutants of hTDE1. For each clone tested, each experiment was repeated in duplicate a total of 3 to 7 times. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum 50 μ g/ml gentamycin and 2.5 μ g/ml amphotericin. Cell Proliferation reagent WST-1 was added to the cells 24, 48, 72 or 96 hours after cell seeding. The relative absorbance at 450 nm for individual clones was normalized to the corresponding 24 hour reading.

Figure 4. immortalization assay. After transfection, REF cells were selected with 35 μ M hygromycin B and resistant clones were counted (PGK-GFP-LT and PGK-hTDE1-GFP). Total clones represent the results from 6 independent transfections. Raw data were converted to log 10 for calculation. Isolated hygromycin B resistant clones are shown in A. The immortalization rate was calculated as the ratio of immortal clones compared to the number of hygromycin B resistant clones (B). Columns connected by

brackets were been compared and p values are indicated. Asterisks represent a significant difference between columns.

Figure 5. Cellular migration and invasion assay. (A) Wound closure assay. Wound closure was calculated by estimating the cell-free area at the time of wounding and again after 24 hours of cell growth. Several independent wounds were generated on monolayers of Rat-1 cells (control) as well as stable transfected clones expressing full-length hTDE1 (PGK-hTDE1-34 and 24), for a total of 26 to 42 wounds. The average differences in the cell free area following the wound and 24 hours later are presented as Log 10 values. No statistically significant difference was noted between the control and hTDE1 transfected cells. (B) Matrigel invasion experiment. Twenty four hours after seeding, all cells that were able to cross a matrigel barrier were fixed, colored and counted. Experiments were repeated at least in duplicata, 4 to 6 times. Raw data was converted to log 10 for calculations. The double asterisks indicates a significant difference in cell migration rate as compared to the Rat-1 with a $p < 0.01$ value while a single asterisk indicates a $p < 0.05$ value. (C) Percentage of cells crossing the Matrigel matrix.

Figure 6. Apoptosis assay. Apoptosis was induced by replacing media with either serum-free media, or complete media supplemented with 40 μM etoposide. Apoptosis was assessed by Hoechst staining (A and C) and caspase-3 activity measurement (B). Hoechst staining experiments were repeated 3 to 4 times and for each assay, 11 to 16 independent fields were analyzed. Capsase-3 activity was measured as pmoles / mg.min and experiments were repeated twice in duplicate. White columns represent Rat-1 cells,

stripped columns represent PGK-hTDE1-24 expressing cells and yellow columns represent PGK-hTDE1-34 expressing cells.

Figure 7. DNA ladder and determination of hypodiploid DNA content. (A) Detection of apoptotic DNA Ladder. Apoptosis was induced in Rat-1 control and transfected cells with 40 μ M etoposide, and in HEK-293 control and transfected cells with 10 μ M etoposide. DNA was extracted after 24 (lane 2), 48 (lane3), and 72 (lane 4) hours, and was compared to untreated cells (lane 1). 20 μ g of each sample was electrophoresed on a 1.6% agarose/ethidium bromide gel.

(B) Flow cytometric analysis of sub-G1 DNA content. All samples previously shown to displaying the typical DNA ladder were subsequently used to analyze hypodiploid DNA content. Cells were collected and fixed in 70% ethanol for one hour. Fixed cells were treated with RNase and then stained with 40 μ g/mL propidium iodine. Sub-G1 peaks are presented as the percentage of hypodiploid DNA to total DNA content, indicating the apoptotic percentage.

Figure 8. Nude mice xenografts. Nude mice injected with parental Rat-1 cells and different transfected cells were monitored for tumor development. Tumor size was measured on average every ten days. Around 50 days, four of six PGK-hTDE1-34 expressing mice were sacrificed due to large tumor size. Clones PGK-hTDE1-24 and PGK-hTDE1-GFP-16 produced large tumors at around 80 days post-injection.

TDE1/TMS family

A

mouse-gene name	Chromosome location	% protein homology with TDE1	Ensemble ID
TDE1/TMS-1/AIGP1	2	99-100%	ENSMUSG00000017707
RIKEN MGI 2441812	2	31%	ENSMUSG000000046110
RIKEN MGI 1919132	4	49%	ENSMUSG000000023232
TMS-2	10	57%	ENSMUSG000000019877
RIKEN MGI 2444223	13	37%	ENSMUSG000000021703

human-gene name	Chromosome location	% protein homology with HTDE	Ensemble ID
hTDE1	20	100%	ENSG00000132824
TDE2L	1	50%	ENSG00000168528
TPO1(c5orf12)	5	38%	ENSG00000164300
TDE2	6	58%	ENSG00000111897
47 kDa protein [Acc:IP00376054]	15	32-34%	ENSG00000184716

B

Potential mouse/human homologues	% protein homology	Chromosome synteny
TDE1/TMS-1/AIGP1: hTDE1	77%	yes
RIKEN MGI 2441812: 47 kDa protein [Acc:IP00376054]	71-91%	yes
RIKEN MGI 1919132: TDE2L	85%	yes
TMS2: TDE2	95%	no
RIKEN MGI 2444223: TPO1(c5orf12)	81%	yes

Table1

(a) Summary of TDE1/TMS family members. Information on family members was obtained from The Wellcome Trust Sanger Institute, Ensemble server, July 2004.

(b) Comparison of human and mouse family members. Percent identity was evaluated using the BLAST 2 SEQUENCES tool available on National Center for Biotechnology information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.)

Figure 1, Bossolasco et al.

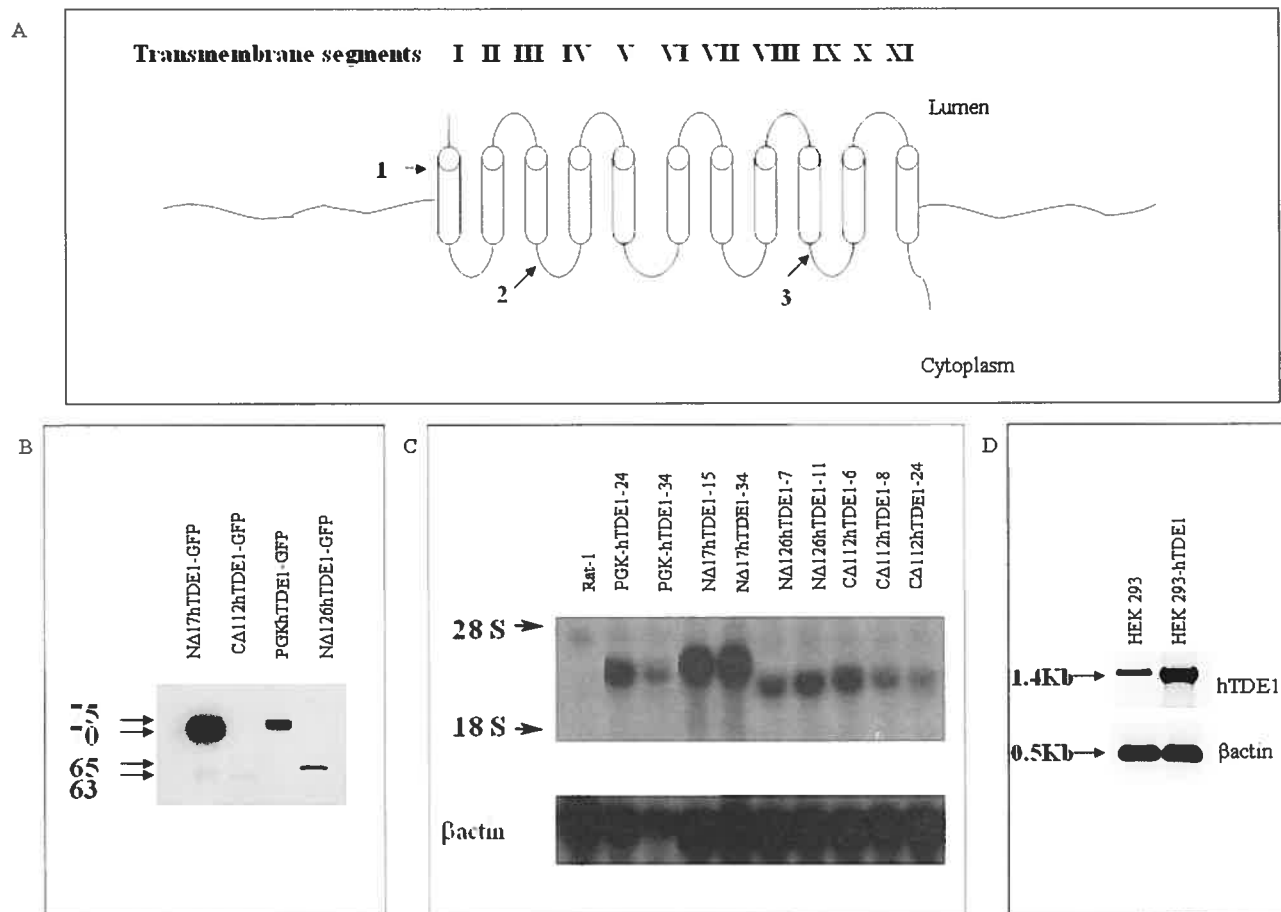


Figure 2, Bossolasco et al.

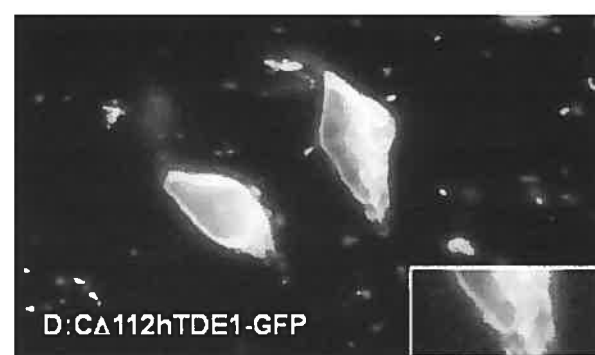
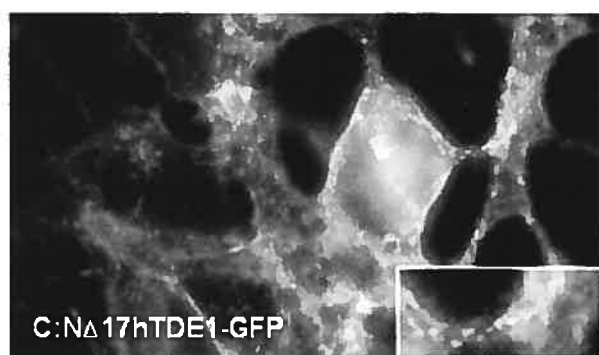
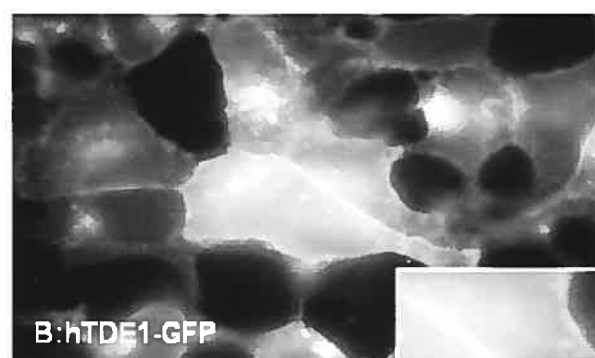
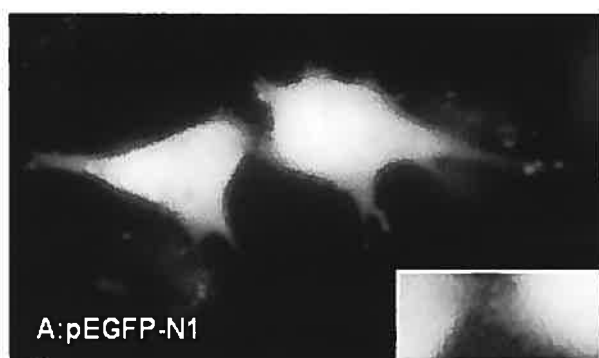
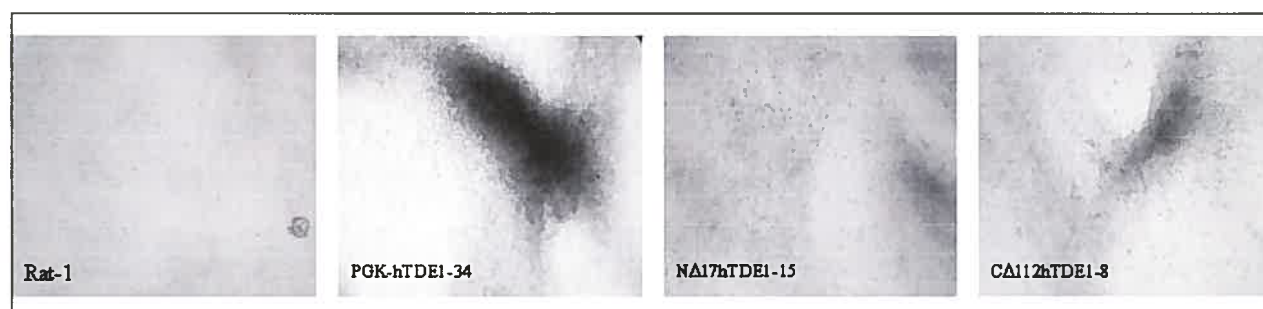
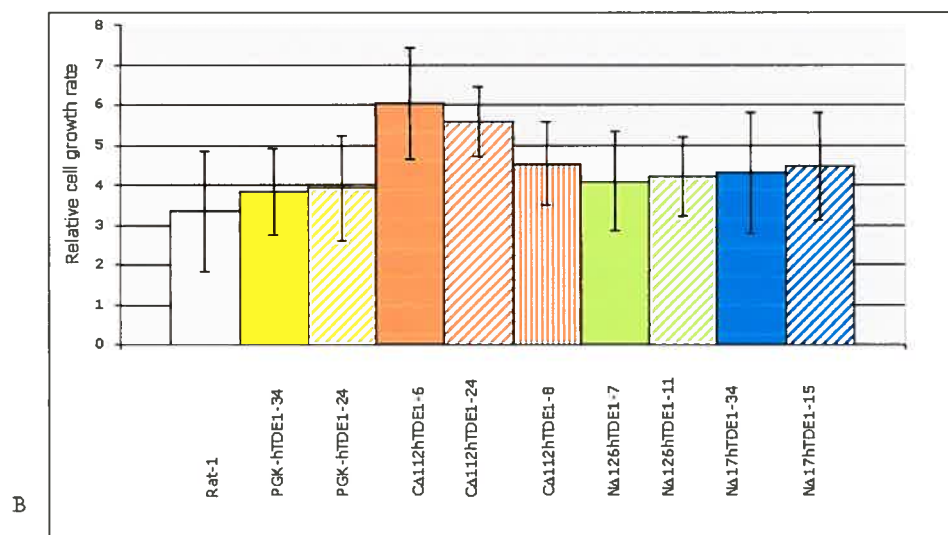


Figure 3, Bossolasco et al.



A



B

Figure 4, Bossolasco et al.

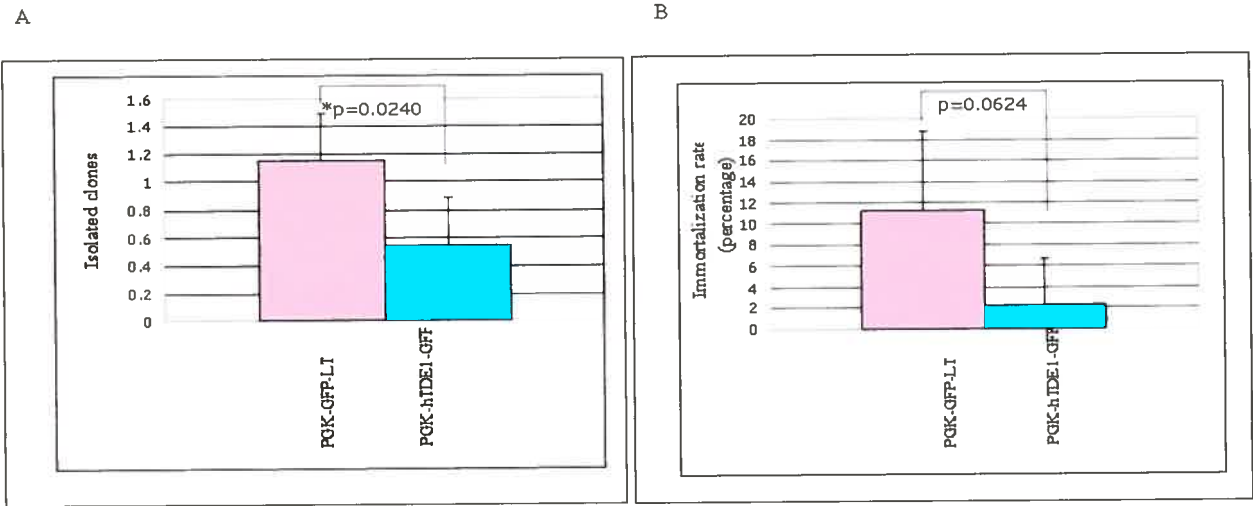
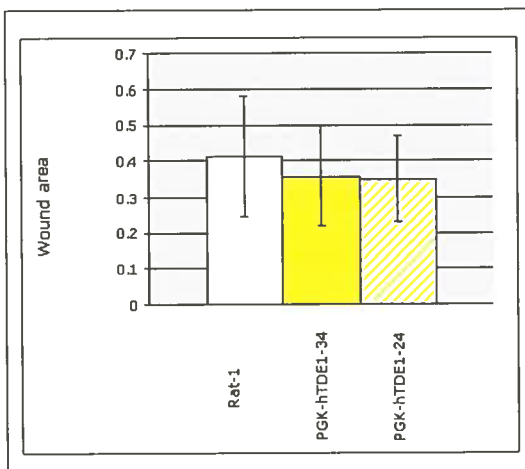
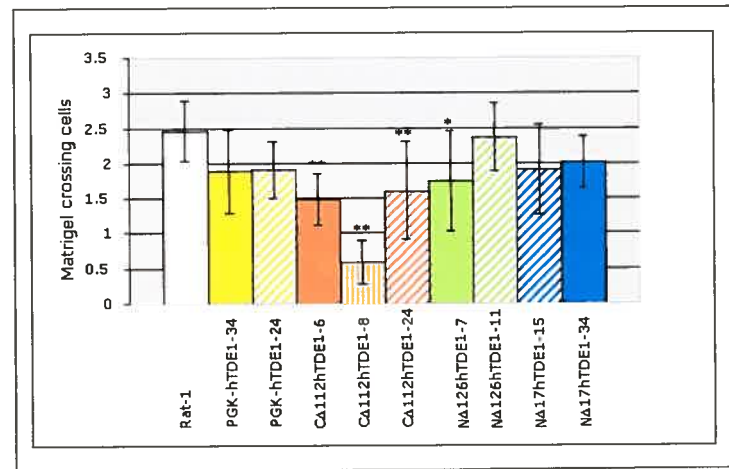


Figure 5, Bossolasco et al.

A



B



C

	% of cells crossing the Matrigel
Rat-1	100
PGK-hTDE1-34	76.2106636
PGK-hTDE1-24	77.35833113
CA112hTDE1-6	60.05734472
CA112hTDE1-8	23.74698085
CA112hTDE1-24	65.01087362
NA126hTDE1-7	70.60763802
NA126hTDE1-11	96.09839298
NA17hTDE1-15	77.61718846
NA17hTDE1-34	81.81184487

Figure 6, Bossolasco et al.

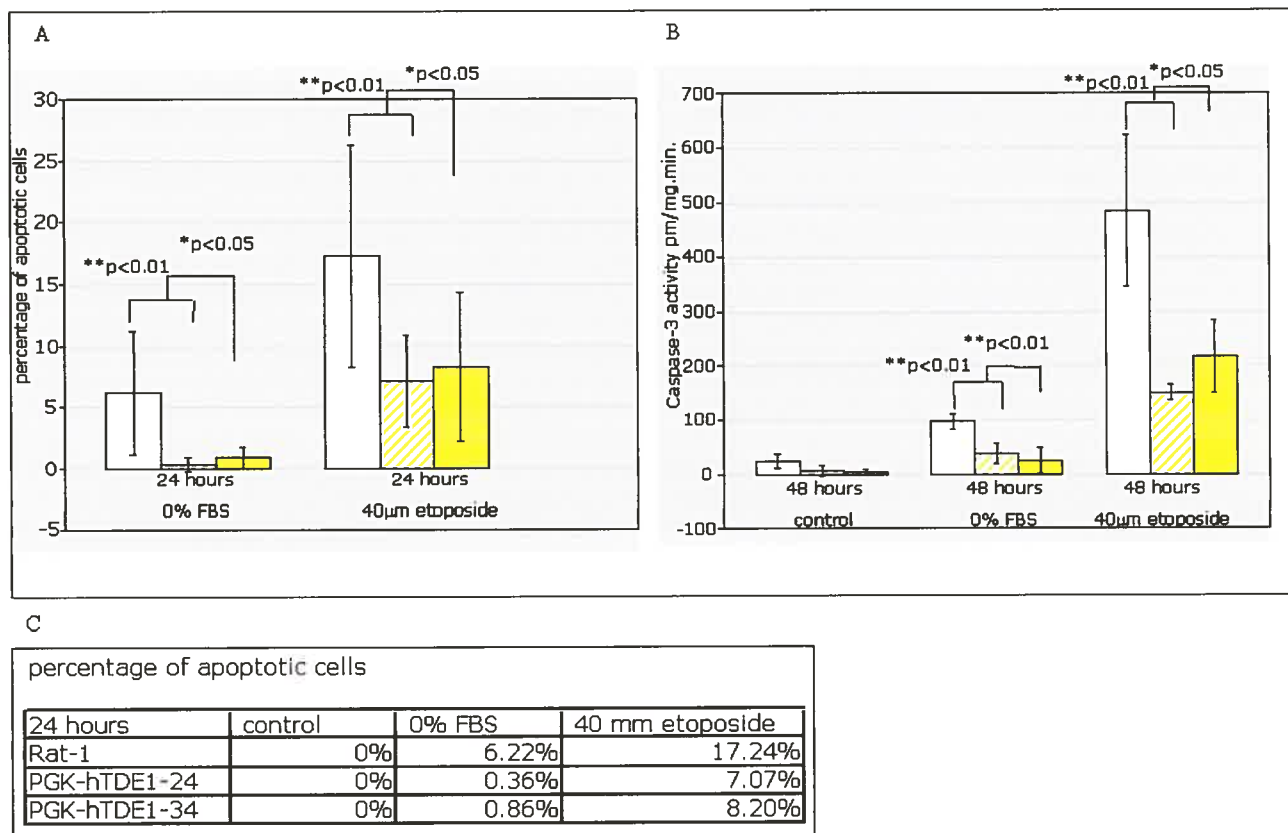


Figure 7, Bossolasco et al.

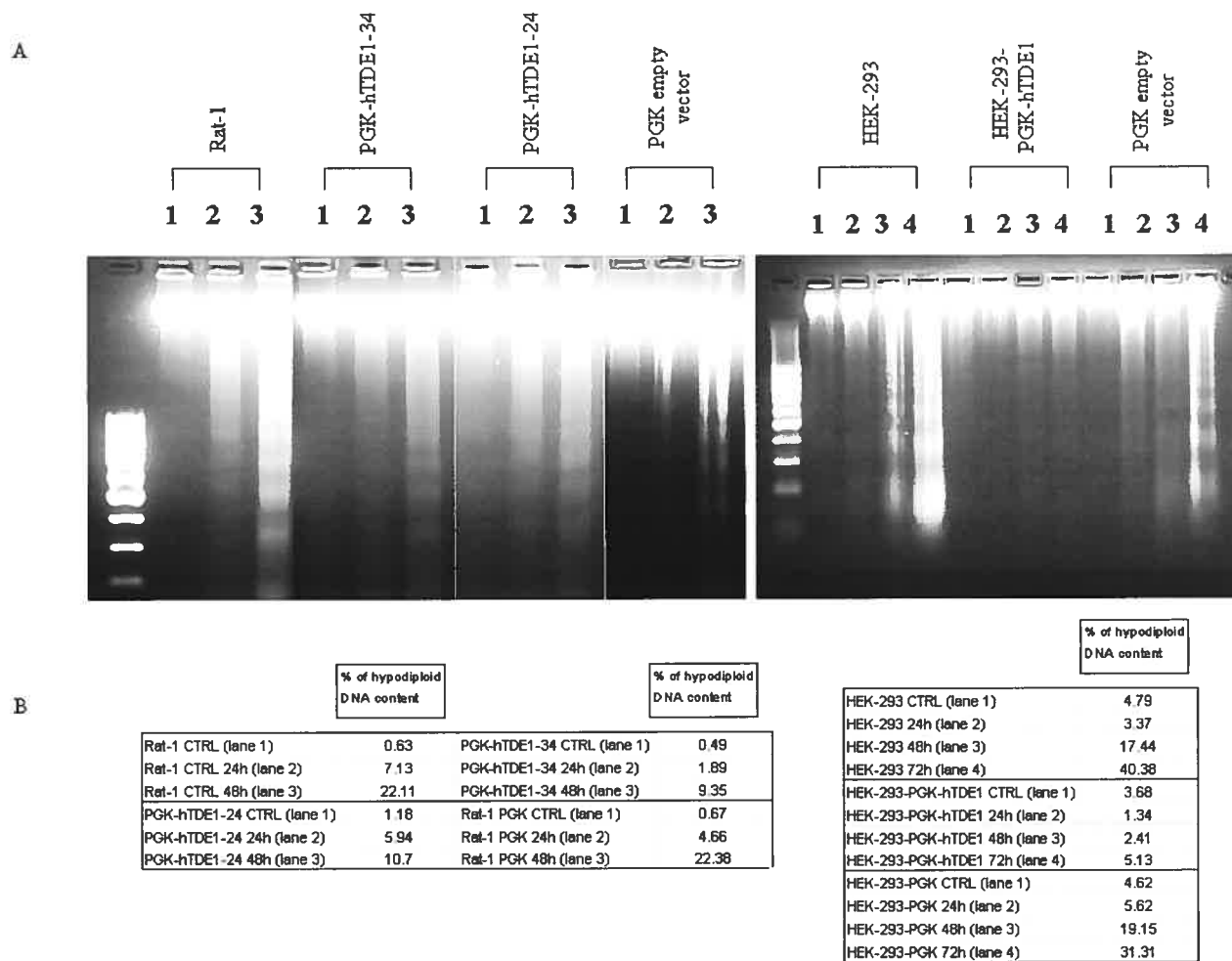
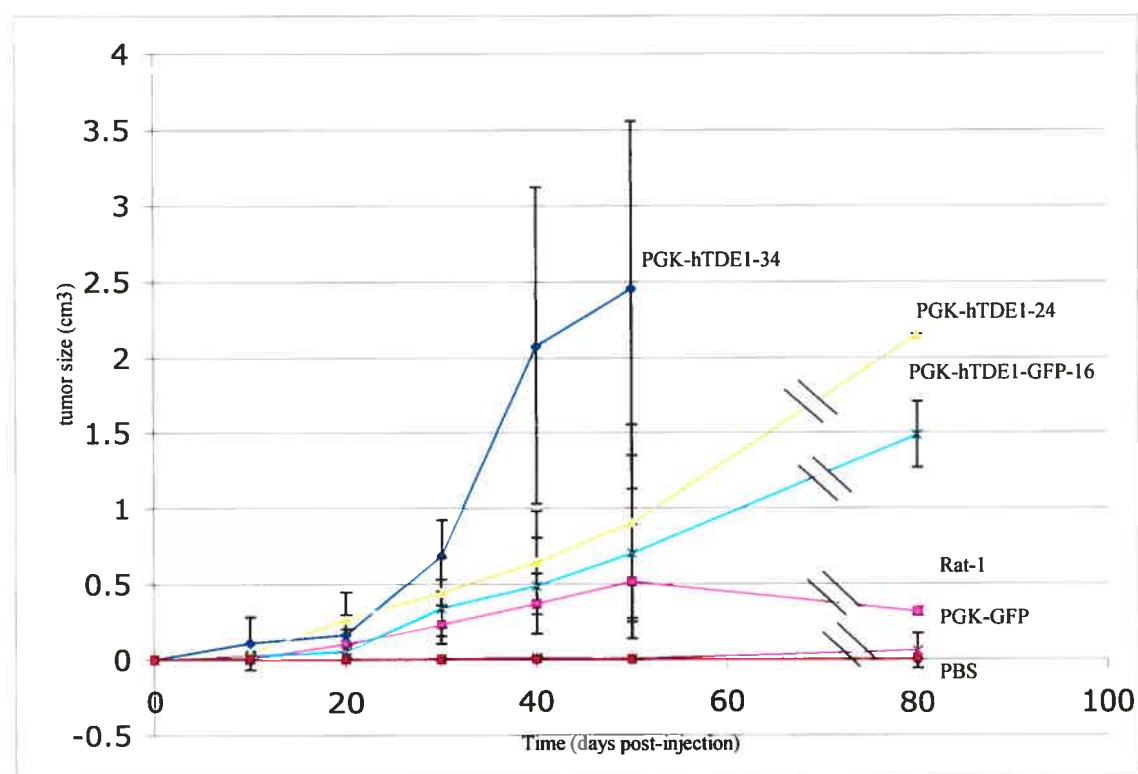


Figure 8, Bossolasco et al.



DISCUSSION

8.0 Discussion

Un grand nombre de souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome ont été générées afin d'étudier le processus de tumorigénèse (16, 17, 50, 51, 125, 168, 202, 273). L'antigène grand T du virus de polyome possède un potentiel immortalisant, mais n'est pas capable à lui tout seul de transformer les cellules *in vitro*. Dans un contexte *in vivo*, comme dans le cas de souris transgéniques, les animaux développent des tumeurs. Mais la latence avec laquelle apparaissent les tumeurs suggère que, bien que l'expression de l'antigène grand T soit nécessaire, PyLT n'est pas suffisant au développement tumoral. Des événements secondaires sont donc requis lors du processus de transformation. Les souris transgéniques MT-PVLT-10, porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome sous le promoteur de la métallothionéine ont donc été générées dans notre laboratoire afin d'isoler certains de ces événements secondaires. Le promoteur de la métallothionéine induisait l'expression de PyLT dans les vésicules séminales, dans les testicules et dans les reins des souris MT-PVLT-10. À partir de ce modèle, plusieurs gènes différentiellement exprimés entre des lésions pré- et post-adénomateuses ont été isolés (199, 201). Un gène en particulier, nommé *TDE1*, surexprimé dans les tumeurs testiculaires de souris âgées de huit à douze mois était d'un intérêt particulier. En effet, puisque la surexpression constitue une des stratégies souvent adoptée afin d'altérer la fonction de gènes dans le dessein de transformer la cellule, *TDE1* pouvait représenter un candidat important dans la progression tumorale. De plus, lorsqu'un fragment du gène murin fut utilisé en tant que sonde afin de déterminer les niveaux d'expression du gène dans des tissus humains,

plusieurs ARN messagers ont été observés, suggérant la présence de séquences homologues chez l'humain. Nous avons donc décidé d'isoler et de caractériser un homologue humain, afin d'en étudier le rôle éventuel dans la tumorigénèse humaine.

8.1 Clonage de *hTDE1*, l'homologue humain du gène *TDE1* et membres de la famille TDE1/TMS

Nous avons comparé la séquence murine de *TDE1* avec un grand nombre de séquences humaines disponibles dans la banque de données Gênant. De cette façon, il a été possible d'identifier, à partir de bibliothèques correspondantes à des tissus provenant de fœtus ou de placenta humain, plusieurs transcrits hautement homologues à la séquence de *TDE1* murin. Nous avons donc été en mesure de générer une sonde humaine que nous avons utilisée, par buvardage, pour vérifier la présence effective de messagers sur de l'ARN provenant de placenta humain. Nous avons ainsi identifié quatre transcrits différents. Suite au criblage d'une bibliothèque de cDNA provenant du même tissu, nous avons enfin cloné plusieurs séquences qui représentaient donc des homologues humains du gène de *TDE1*. Une première séquence, longue de 1419 paires de bases, que nous avons appelée *hTDE1*, représentait la pleine longueur du gène. En effet, en 5', en amont du codon initiateur de traduction, on retrouve une séquence consensus de Kozak, caractéristique d'un signal de début de traduction de la séquence nucléotidique en protéine (190). En 3', nous avons identifié, en aval du codon d'arrêt de traduction, une queue de polyadénine, qui représente donc la portion terminale de traduction de *hTDE1*. Deux des clones isolés à partir de la bibliothèque de placenta humain résultent probablement de la présence de sites de polyadénylation différents. Un polymorphisme, en position

1386, qui substitue une adénine avec une guanine, et remplace ainsi sur la séquence protéique une thréonine avec une alanine, a également été identifié. Enfin, un dernier clone présente un épissage alternatif à l'intérieur de la séquence entre les nucléotides 1028 et 1212, élimine soixante et un acides aminés, et permet donc la traduction d'une protéine différente de la pleine longueur. Toutes ces modifications peuvent expliquer la présence des quatre différents transcrits identifiés par buvardage sur de l'ARN humain de placenta. Lorsque nous avons comparé la séquence pleine longueur de *hTDE1* avec d'autres séquences humaines connues, nous avons pu identifier un homologue (*Diff33/SBBI99*) qui présentait 99% d'homologie de séquence nucléotidique, mais dont l'homologie de séquence protéique n'était que de 88% à cause d'un décalage du cadre de lecture. Il existait donc plusieurs variantes de la séquence, pouvant générer des protéines semblables mais différentes, mais aucune information n'était disponible quant à leur fonction. Nous avons localisé le gène sur le chromosome 20, en région q13.1-13.3. La localisation fut ensuite confirmée (Ensemble, The Wellcome Trust Sanger Institute; NCBI Ace View). À partir d'informations provenant du serveur Ace View (NCBI) il a été établi que la séquence génomique complète de *hTDE1* s'étale sur 36.55 kb. Une même séquence d'ADN génomique semble être à l'origine des différents variants. Cependant, l'analyse permet de déterminer la présence de quinze introns potentiels, possédant des séquences d'épissage consensus. La séquence peut générer par épissage alternatif, treize différents transcrits, codant pour huit isoformes protéiques potentiellement différentes. Un des variants identifiés, possède 11 exons dans sa séquence génomique, code pour une protéine de 473 acides aminés et correspond très probablement au transcrit que nous avons isolé et appelé *hTDE1*. L'analyse effectuée sur 629 différents clones de cDNA, provenant de plusieurs tissus normaux et néoplasiques a

révélé la présence de séquences hautement homologues à *hTDE1* sur 596 clones différents. *HTDE1* ainsi que ses variants semblent donc s'exprimer de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus humains. Un grand nombre de polymorphismes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont également été identifiés sur les différentes séquences analysées. Les informations dont nous disposons ne nous permettent pas de déterminer s'il s'agit d'erreurs de séquençage plutôt que de polymorphismes géniques ayant une signification biologique, mais il est clair qu'il existe une grande variabilité de séquence. De plus, quatre gènes différents, homologues en séquence au gène codant pour *hTDE1*, ont également été identifiés, et sont localisés sur quatre autres chromosomes. Il a donc été possible de regrouper ces différentes séquences géniques à l'intérieur d'une même famille appelée TDE1/TMS. Le gène *TDE2L* (*FKSG84/TDE2*) est localisé sur le chromosome 1 et partage 49% d'homologie de séquence avec *hTDE1*. L'étude par hybridation *in situ*, ainsi que par PCR quantitatif en temps réel de l'expression du gène dans des tissus dérivés de poumons normaux ainsi que de tumeurs pulmonaires, permet de démontrer une surexpression de *TDE2L* dans ces derniers, suggérant donc que ce nouveau membre de la famille pourrait également participer au processus de néoplasie (267). Sur le chromosome 5 est localisé le gène *c5orf12*, 37% homologue avec *hTDE1* (371). Le transcrit du gène s'exprime dans la plupart des tissus analysés et possède, de manière semblable aux autres membres de la famille, plusieurs domaines transmembranaires. Puisque *c5orf12* pourrait représenter l'homologue humain du gène de rat *TPO1*, il a été suggéré qu'il pourrait également contribuer à la myélinogénèse des axones du système nerveux central, mais d'autres évidences expérimentales sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Sur le chromosome 6 est localisé le gène *TDE2*, avec 56% d'homologie avec *hTDE1*. L'expression du gène a

été détectée dans des cancers de poumon et de foie (379). Enfin, un autre gène pouvant appartenir à la même famille a été identifié sur le chromosome 15. Bien que certaines fonctions aient été proposées, des études plus approfondies sont nécessaires afin d'attribuer un rôle définitif et convainquant à chacun des membres de la famille. Chez la souris, on retrouve également plusieurs gènes, qui, par homologie de séquence, sont inclus dans la même famille. *TDE1*, isolé dans notre laboratoire, fut le premier gène de la famille à être identifié (201). Deux autres groupes ont ensuite décrit des séquences identiques ou hautement homologues, qu'ils ont nommées *TMS-1* et *AIGP1*, mais qui vraisemblablement représentent le même gène (8, 128). La séquence protéique de *TDE1* présente 77% d'homologie de séquence avec *hTDE1*, et le gène localise sur le chromosome 2, dans une région génétique syntenique à l'humain, ce qui suggère qu'il pourrait représenter l'homologue murin de *hTDE1*. Trois autres gènes ont ensuite été identifiés sur les chromosomes 4, 10 et 13 et pourraient à leur tour représenter les homologues respectifs de certains des gènes humains de la famille *TDE1/TMS* (voir Table 1). Encore une fois, pour chacun d'eux, plusieurs variantes de séquences semblent exister, représentant peut-être des polymorphismes à l'intérieur d'une même séquence génomique. La situation chez la souris ressemble donc à celle que l'on retrouve chez l'humain; il a été possible d'identifier plusieurs gènes apparentés, permettant donc d'établir l'existence d'une nouvelle famille de protéines.

Cette famille regroupe également des membres appartenant à d'autres organismes eucaryotes, allant de la levure jusqu'à l'humain (InterPro, EMBL-EBI). L'existence de plusieurs gènes possédant des séquences homologues, sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents pourrait s'expliquer par la duplication de la séquence d'un gène ancestral, suivie de sa transposition sur un chromosome

différent. Durant l'évolution, les gènes pourraient avoir divergé suffisamment, engendrant donc la création d'une nouvelle famille de protéines orthologues. Lors de l'évolution, une pression sélective favorisant le maintien de cette famille pourrait être par ailleurs à l'origine de la conservation des séquences homologues à travers les différents organismes. Une étude plus approfondie de l'évolution des séquences est nécessaire afin de confirmer ces propos. Une meilleure connaissance de la fonction de chacune des protéines de la famille est également fondamentale afin de mieux comprendre l'importance de la présence des différentes séquences homologues et d'en comprendre la portée biologique. En effet, la présence de séquences conservées dans l'arbre phylogénique n'est pas toujours synonyme d'une fonction vitale de la protéine. Mais pour une raison encore inconnue, une pression sélective importante s'exerce très probablement pour le maintien de la séquence lors de l'évolution. Lorsque Grossman et son groupe ont aboli chez la levure l'expression de *tms1*, un membre de la famille des TDE1/TMS, aucun phénotype ne fut détecté. Même lorsque soumis à plusieurs formes de stress, la levure dépourvue de *tms1* semble répondre de manière semblable au type sauvage. Il est peu probable que la raison pour laquelle il n'est pas possible d'associer de phénotype à l'ablation du gène s'explique par le fait que le gène soit inutile à la cellule. En effet, le maintien de matériel génétique superflu représente une dépense énergétique que la cellule n'assumerait probablement pas. Une explication tentante serait au contraire que la fonction des membres de la famille est essentielle à la survie de la cellule, justifiant la présence redondante de séquences homologues pouvant remplir le même rôle. La séquence du gène *tms1* est localisée sur le chromosome IV de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chez cette souche de levure, il ne semble pas exister de séquences homologues sur d'autres chromosomes. Mais il est toujours possible

d'envisager l'existence d'autres protéines, codées pas des gènes non homologues, pouvant remplir la même fonction. L'expression de certains membres de la famille est également tissus spécifique; c'est le cas par exemple du gène murin *TMS-2*, que l'on retrouve spécifiquement dans le système nerveux central de la souris, ce qui pourrait également justifier l'abondance de séquences homologues. Cependant, le gène codant pour hTDE1 semble plutôt s'exprimer dans la plupart des tissus humains.

8.2 Structure et localisation cellulaire de la protéine

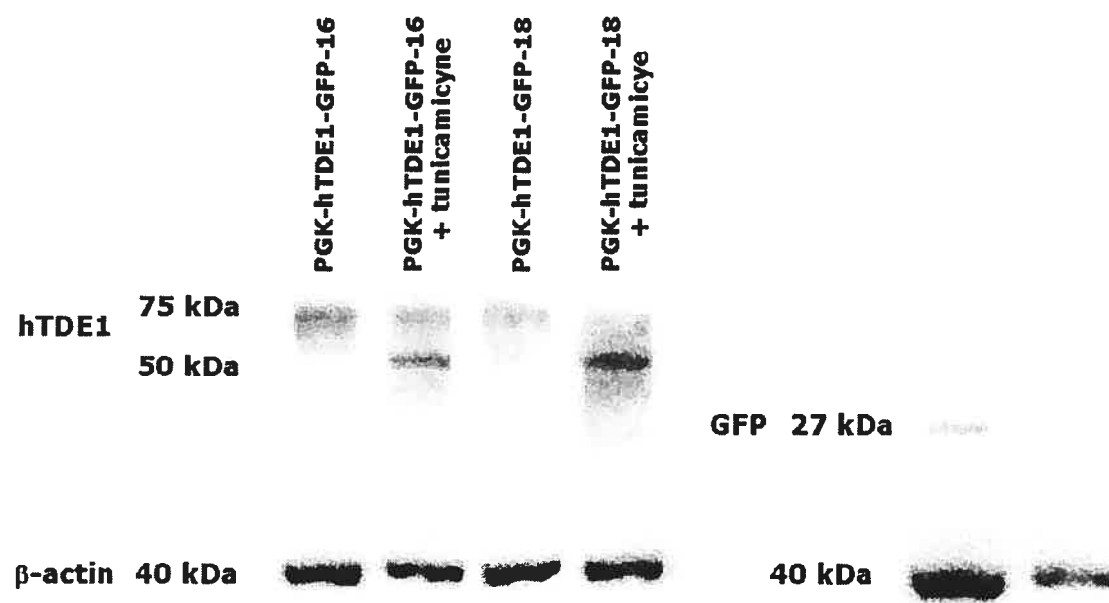
La structure d'une protéine peut fournir des informations utiles quant à sa fonction (28). La plupart des membres de la famille TDE1/TMS partagent une structure semblable, incluant la présence de plusieurs domaines transmembranaires, de plusieurs sites de phosphorylations, ainsi que pour certains la présence en N-terminal d'une séquence signal (The PredictProtein server). Nous avons restreint notre étude à la séquence codante de *hTDE1* correspondant à un des clones pleine longueur isolé à partir d'une librairie de cDNA de placenta. Selon la méthode employée pour l'analyse, la séquence protéique de hTDE1 révèle la présence de six à onze domaines hydrophobiques de type alpha-hélice, potentiellement transmembranaires, localisant donc très probablement la protéine à une des membranes de la cellule (8, 29, 128, 192, 267, 371). En accord avec l'analyse d'hydrophobicité présentée sur Ensemble (Ensemble, The Wellcome Trust Sanger Institute; NCBI Ace View), et conformément à la dernière version disponible du logiciel TMHMM, nous avons retenu à onze le nombre de domaines transmembranaires de la protéine hTDE1. La grande majorité des protéines membranaires qui possèdent plusieurs domaines transmembranaires agissent dans la

cellule en tant que récepteurs ou transporteurs. Parmi elles, on retrouve les récepteurs couplés aux protéines G, caractérisés par la présence de sept domaines transmembranaires. Différents ligands agissent sur cette famille de récepteurs, incluant plusieurs hormones, différents neurotransmetteurs, des chemokines, les ions calcium, certains facteurs de croissance et de différenciation. Ils jouent également un rôle prépondérant dans la perception sensorielle et sont responsables de notre sens du goût et des odeurs. Certains sont également activés par les photons de la lumière (262). L'analyse d'homologie de séquence ne permet pas d'inclure hTDE1, ainsi que ses homologues, dans cette famille de récepteurs membranaires. Un deuxième groupe de protéines membranaires caractérisées par la présence de multiples domaines transmembranaires est représenté par les canaux ioniques et les échangeurs d'ions et d'acides aminés. Encore une fois, le degré d'homologie ne permet pas d'associer la famille des protéines TDE1/TMS à une de ces familles de transporteurs ioniques. Il en est de même pour la nouvelle famille de transporteurs de nucléosides ENT caractérisée par la présence de onze domaines transmembranaires, mais qui ne partagent aucune homologie de séquence avec l'ensemble des protéines TDE1/TMS (156). De toute évidence, il est donc légitime de regrouper hTDE1 et ses homologues dans une toute nouvelle famille de protéines. Il a été suggéré que deux des membres de la famille, les produits des gènes murins *TMS-1* (*TDE1/AIGP1*) et *TMS-2*, pourraient agir en tant que transporteurs du glutamate (128). En effet, les auteurs démontrent, par hybridation *in situ*, une expression très abondante des deux gènes dans une région riche en neurones glutamatergiques (175), où par conséquent se localisent un grand nombre de transporteurs de neurotransmetteurs. Hélas, les auteurs n'ont pas été capables de démontrer *in vitro* l'incorporation de glutamate à l'intérieur de cellules surexprimant le

gène *TMS-2*. La seule expression des gènes *TMS-1* et *TMS-2* dans ces régions synaptiques n'est pas suffisante pour déterminer si oui ou non les produits de ces gènes sont réellement impliqués dans le transport du glutamate.

La glycosylation et la phosphorylation représentent des modifications post-traductionnelles clé lors de la synthèse protéique. La protéine hTDE1 présente trois sites de N-glycosylation de même que huit sites potentiels de phosphorylation par la caséine kinase II et quatre sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C. Lors de la glycosylation, par une liaison N-glycosidique sur une asparagine, un oligosaccharide est ajouté à la séquence protéique. Cette modification représente une étape essentielle dans le contrôle de la qualité du repliement et de l'assemblage des protéines, lors de leur passage à travers le réticulum endoplasmique. La glycosylation joue un rôle important également dans la stabilité structurale des protéines, et lors du processus de sécrétion (84, 167, 369). Nous avons expérimentalement démontré que la protéine hTDE1 pouvait être glycosylée. Le poids moléculaire théorique de hTDE1 est d'environ 50 kDa, alors que la protéine native migre par électrophorèse à un poids moléculaire supérieur, d'environ 75kDa. Lorsque nous empêchions le processus de glycosylation par l'utilisation de tunicamycine, nous observions un décalage de migration sur gel d'acrylamide et la protéine déglycosylée migrerait alors en accord avec son poids théorique (figure 5 et annexes) Ce résultat suggère donc que hTDE1 est effectivement glycosylée et permet également d'expliquer la discordance observée entre le poids théorique et réel de la protéine. Un résultat analogue fut décrit par Aoki et ses collègues pour un autre membre de la famille TDE1/TMS, le produit du gène murin *AIGP1* (*TDE1/TMS-1*) (8). Nous ignorons cependant à ce jour si la glycosylation contribue à la fonction de la protéine. La phosphorylation protéique représente une autre modification

Figure 5: Glycosilation de la protéine hTDE1



post-traductionnelle majeure. L'ajout d'un groupe phosphate par une kinase sur certains acides aminés, le plus souvent sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine, altère la structure secondaire de la protéine. Il s'agit d'un processus réversible qui permet donc de moduler, en fonction des nécessités de la cellule, l'activité enzymatique d'un grand nombre de protéines et joue un rôle sur la plupart des processus cellulaires tels que la croissance, la transcription génique, la synthèse protéique et la signalisation cellulaire. Puisque l'on retrouve des sites potentiels de phosphorylation sur la séquence protéique de hTDE1, il est possible que ce processus représente un des mécanismes de régulation de sa fonction, mais c'est une hypothèse qu'il reste à vérifier. Il est intéressant de noter que cinq des douze sites potentiels de phosphorylation se situent dans les derniers 112 acides aminés en région C-terminale de la protéine. Ces cinq sites de phosphorylation sont donc éliminés dans le mutant en C-terminal que nous avons généré pour notre étude. Il serait tentant d'avancer l'hypothèse que, de manière semblable à un grand nombre de récepteurs, par exemple les récepteurs couplés aux protéines G, cette région de phosphorylation représente un site de régulation très important permettant de moduler l'activité de la protéine (83, 93, 104).

Un domaine hélice-boucle-hélice de type myc à également été identifié sur la séquence protéique de hTDE1 et de plusieurs membres de la famille (128, 267). Cette portion de 9 acides aminés se situe entre les domaines transmembranaires 7 et 8, en position 265 à 273 et correspond à la séquence PRSGLLQSS. Les domaines hélice-boucle-hélice sont caractéristiques de certains facteurs de transcription, ils permettent la dimérisation des protéines et l'attachement à l'ADN sur des séquences spécifiques (334). Normalement, les protéines possédant ce type de domaine agissent au noyau. Or, la structure de hTDE1 identifie plusieurs domaines hydrophobiques caractéristiques de

protéines qui se localisent à une membrane. La présence du domaine hélice-boucle-hélice est donc difficile à justifier. Il est vrai que dans certains cas, par exemple la famille des protéines SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Protein), les protéines possèdent un domaine de ce type et se localisent normalement à la membrane du réticulum endoplasmique ou du noyau. Ces protéines agissent comme facteurs de transcription et contrôlent l'entrée et la synthèse de cholestérol. Lorsque les niveaux de stérols sont bas dans la cellule, le domaine hélice-boucle-hélice sera excisé par protéolyse, et pourra de cette façon se diriger vers sa destination finale, le noyau (115). La présence de domaines hélice-boucle-hélice n'est donc pas l'exclusivité de protéines strictement nucléaires. Il est cependant difficile pour l'instant d'expliquer le rôle de ce type de structure chez les membres de la famille TDE1/TMS.

La présence de domaines hydrophobiques de type alpha-hélice suggère que les membres de la famille TDE1/TMS se localisent à un des compartiments membranaires de la cellule. Nous avons donc cherché la présence d'un signal de localisation cellulaire particulier qui permettrait de diriger la protéine vers un compartiment spécifique. L'analyse de la séquence par l'utilisation de différents serveurs comme PSORT II, SignalP 3.0 et TMHMM, nous ont permis de déterminer qu'il n'existait sur la séquence protéique de hTDE1 aucun signal de localisation nucléaire, peroxisomal, vacuolaire, ni aucun signal de rétention au réticulum endoplasmique. Un peptide signal est cependant identifiable en N-terminal de la protéine et cette portion se localise très probablement à l'extérieur de la cellule. L'analyse de séquence à l'aide des serveurs PSORT II et signalP 3.0 prédit dans les deux cas la présence d'un site de clivage de la protéine entre les acides aminés situés en position 20 et 21, suggérant que l'extrémité N-terminale pourrait être éliminée lors de modifications post-traductionnelles. De plus, la protéine présente

des sites de myristoylation, en particulier sur sa portion N-terminale. La myristoylation N-terminale représente une modification post-traductionnelle du résidu glycine N-terminal d'une protéine, par formation d'une liaison amide avec l'acide myristique activé sous forme de myristoyl-Coa. Ce processus probablement irréversible *in vivo* a été décrit pour un certain nombre de protéines (30, 277). Les protéines myristoylées ont des localisations tissulaires variées, mais la plupart sont membranaires. En effet, en plus de promouvoir les interactions protéine-protéine, la myristoylation peut permettre l'insertion de la protéine dans la membrane, conférant à l'acide myristique le rôle d'ancre hydrophobe (171, 226, 259, 285). Ces résultats suggèrent donc que cette portion N-terminale pourrait servir à diriger la protéine vers la membrane plasmique de la cellule.

Comme il a été mentionné précédemment, d'après l'analyse d'homologie de séquence, les protéines TMS-1 et AIGP1 représenteraient les homologues murins de la protéine humaine hTDE1. Il serait donc logique d'en déduire qu'elles localisent au même compartiment membranaire. Or, bien que la localisation cellulaire des protéines TMS-1 et AIGP1 ait été décrite, les résultats des deux études diffèrent (8, 128). En effet, d'après Grossman et ses collègues, TMS-1 se retrouve à la membrane plasmique, tandis qu'Aoki et ses collègues localisent AIGP1 au Golgi. Une première tentative de générer un anticorps contre la protéine hTDE1 ayant échoué, nous avons généré une protéine de fusion entre hTDE1 et la protéine fluorescente verte et localisé la protéine à la membrane plasmique. Une partie du signal était également visible autour du noyau, sous forme de granules fluorescents, mais de manière générale, nos résultats concordaient avec les résultats du groupe de Grossman. Il est possible que l'accumulation de la protéine native au réticulum représente un artefact, à cause de la méthode expérimentale que nous avons choisie pour déterminer la localisation de la protéine. En effet, nous

avons surexprimé hTDE1 à l'aide d'un vecteur d'expression eucaryote, produisant donc une quantité très abondante de la protéine. Une fraction pourrait donc s'accumuler lors du transport de celle-ci, de la région périnucléaire à la membrane. Cette accumulation pourrait avoir comme conséquence le repliement défectueux d'un certain nombre de molécules, empêchant ainsi leur localisation à la membrane plasmique (325). Il est également connu qu'un certain nombre de protéines membranaires, incluant des récepteurs, des canaux ioniques et des transporteurs subissent un recyclage. Ce processus permet, par endocytose, d'internaliser et de conserver les protéines à l'intérieur d'un compartiment spécifique. Lorsque nécessaire, il est ainsi possible de re-localiser les protéines à la membrane plasmique (284). Les granules fluorescents que nous avons visualisés pourraient donc correspondre à un tel compartiment de recyclage. Bien évidemment, il n'existe pour l'instant aucune preuve irréfutable de la présence d'un tel compartiment pour les membres de la famille TDE1/TMS.

Afin d'établir si le peptide signal en N-terminal pouvait jouer un rôle lors de l'insertion de la protéine à la membrane, nous avons généré un mutant dépourvu des premiers 17 acides aminés de la protéine. Le signal fluorescent s'accumule en région périnucléaire, possiblement au réticulum endoplasmique et la protéine tronquée n'est alors pratiquement plus capable de localiser à la membrane plasmique. Il a été décrit pour certaines protéines membranaires possédant des signaux de localisation N-terminale, que l'ablation de ce domaine empêche leur intégration définitive à la membrane (325). Nos résultats suggèrent donc que hTDE1 est une protéine membranaire et que sa portion N-terminale est importante à sa localisation finale. Il est intéressant de signaler que lorsque nous avons tronqué hTDE1 en C-terminal, éliminant ainsi 112 acides aminés, la protéine était encore capable de localiser à la membrane

plasmique. Cette observation, à l'appui de notre conclusion, renforce donc le rôle central de la portion N-terminale de hTDE1 lors de la localisation cellulaire de la protéine.

8.3 Caractérisation de l'expression de *hTDE1* dans différents tissus et localisation chromosomique du gène codant pour hTDE1

L'étude du gène murin de *TDE1* a démontré l'expression ubiquitaire de l'ARN messager du gène dans la plupart des tissus de la souris. Mais le niveau d'expression différait significativement lorsque l'on comparait des lignées cellulaires et de tissus d'origine normale et d'origine tumorale, puisque *TDE1* était systématiquement surexprimé dans ces derniers (201). Lorsque nous avons effectué l'analyse de l'expression du gène humain *hTDE1*, sur des tissus et des lignées cellulaires de prostate, d'ovaire, de colon, de foie, de glande mammaire et de poumon, le transcrit du gène était toujours détectable, suggérant, de manière semblable au gène de souris, une expression ubiquitaire de *hTDE1*. L'abondance de ESTs (Expressed Sequence Tags) correspondants à la séquence de *hTDE1* dans les banques de données, et leur identification à partir d'une grande variété de tissus différents, appuie fortement l'hypothèse d'une expression généralisée du gène (Unigene, AceView NCBI). Cependant, comme il a été mentionné précédemment, plusieurs gènes appartiennent à la famille TDE1/TMS, et plusieurs variants ont été identifiées à l'intérieur d'une même séquence. De plus, les différents ESTs disponibles ne couvrent qu'une brève portion d'environ 200 paires de base sur la séquence. Nous ne pouvons donc établir avec certitude que seul *hTDE1* est réellement représenté dans chacun de ces tissus. Fort probablement, d'autres membres de la famille sont également présents. Chez la souris, il a été possible de distinguer l'expression du

gène *TMS-1* de celle du gène *TMS-2*, et d'identifier ainsi une distribution tissulaire spécifique à chacun des deux transcrits (128). Une analyse plus approfondie est donc nécessaire afin de permettre de distinguer l'expression d'un des membres de la famille par rapport aux autres. Ainsi, il sera également possible de vérifier s'il existe une spécificité tissulaire d'expression, propre à certains membres de la famille.

Afin de déterminer le patron d'expression de *hTDE1* dans un contexte tumoral, nous avons analysé l'expression du gène sur des tissus normaux et tumoraux d'ovaire, de prostate et de poumon. Alors qu'aucune différence n'était détectable entre l'ovaire normal et sa tumeur respective, de même qu'entre la prostate normale et sa tumeur respective, plusieurs tumeurs pulmonaires exprimaient *hTDE1* à des niveaux supérieurs, de quatre à dix fois plus que chez le poumon normal. Nous avons normalisé nos résultats à l'expression de la β -actine. Il est cependant de moins en moins accepté que les niveaux d'expression de β -actine sont constants et par conséquent représentatifs de la quantité d'ARN déposée sur le gel. Il existe deux grands types de cancers des poumons. Le premier type, est dit «à petites cellules» (SCLC), évolue rapidement et est également plus susceptible de s'étendre à d'autres organes. Il représente 20 à 25 % des tumeurs pulmonaires. Le deuxième type appelé «à grandes cellules» ou «non à petites cellules» (NSCLC), regroupe les cancers épidermoïdes (35-40%), les adénocarcinomes (25-35%) et les carcinomes à grandes cellules d'autres types (10-15%). Un plus petit pourcentage de tumeurs (1-2%), plus rares, est également représenté par les tumeurs carcinoïdes et les tumeurs muco-épidermoïdes. Les échantillons de tumeurs pulmonaires que nous avons analysés provenaient de tumeurs «à petites cellules» et de tumeurs «à grandes cellules» de type épidermoïdes et adénocarcinomes, représentant donc la majorité des

cancers pulmonaires existants. Aucune corrélation entre les niveaux d'expression de *hTDE1* et la pathologie de la tumeur n'a pu être établie. Certaines tumeurs exprimaient différentes isoformes de la séquence, mais encore une fois, nous n'avons pu identifier aucune spécificité d'expression quant au type de tumeur analysé. Suite à l'apparition de nouvelles technologies comme les micro-puces à ARN et les puces à protéines, un certain nombre de chercheurs ont entamé des études de profil d'expression dans le cancer du poumon. Ces études étaient vouées à l'identification de gènes pouvant servir de marqueurs pronostiques lors de la progression tumorale, ainsi qu'à l'identification de patrons d'expression spécifiques à chacun des différents types de cancers du poumon (6, 7, 18, 21, 110, 245, 372). Ni *hTDE1*, ni aucun autre membre de la famille n'ont été identifiés parmi les candidats les plus robustes de ces différentes analyses. Nous avons récupéré les données brutes de l'analyse effectuée par Bhattacharjee et ses collègues, et avons pu démontrer une certaine tendance, dans des échantillons de carcinoïdes pulmonaires, à surexprimer *hTDE1* lorsque comparé à des échantillons de poumons normaux. Mais de manière générale, les données obtenues par l'analyse des micro-puces à ARN ou par protéomique, disponibles en littérature, ne semblent donc pas corroborer nos résultats expérimentaux quant à la surexpression de *hTDE1* dans le cancer du poumon. Il est à noter que l'analyse effectuée par l'utilisation des micro-puces ne permet de mettre en évidence que l'expression d'une séquence particulière puisque l'analyse est effectuée par le biais de sondes séquence-spécifiques d'une longueur d'environ 20 bases. Nos expériences d'expression effectuées par la technique du buvardage à l'ARN détectent la présence de plusieurs transcrits dans le même tissu. Or la micro-puce utilisée par Bhattacharjee et ses collègues ne contenait qu'une sonde en 3' de la séquence. Nous savons cependant qu'il existe plusieurs variants de la séquence codante de *hTDE1*, dont

certaines diffèrent en 3'. Alors que l'analyse d'expression par buvardage d'ARN permet l'utilisation d'une sonde correspondant à la séquence codante complète, et permet donc de détecter toute séquence hautement homologue, un seul de ces variants de *hTDE1* pourrait avoir été détecté lors de cette étude effectuée par micro-puces. Les études effectuées à ce jour par l'utilisation de micro-puces ne fournissent peut-être pas un cadre assez complet du patron d'expression des membres de la famille TDE1/TMS. Il est aussi très important de confirmer les résultats d'analyse d'expression, obtenus à partir de micro-puces, par l'utilisation d'autres techniques comme le PCR en temps réel, et l'analyse de coupes tissulaires par l'hybridation immunohistochimique ou l'hybridation *in situ*. Par analyse sérielle de l'expression des gènes (SAGE), Player et ses collègues ont analysé le profil d'expression génique de cultures primaires et de tissus provenant de poumons normaux et tumoraux de type NSCLC (267). Ils ont ainsi identifié un membre humain de la famille TDE1/TMS, le gène *TDE2L* (*FKSG84/TDE2*). Dans la majorité des échantillons qu'ils ont analysés, le gène s'exprimait plus abondamment dans les tissus d'origine tumorale. Le même patron d'expression était identifiable par RT-PCR, par PCR quantitative en temps réel et par hybridation *in situ*, permettant donc de confirmer les résultats obtenus par la technique SAGE. Aussi, en dépit des résultats obtenus à ce jour par l'étude génomique et protéomique l'analyse par buvardage d'ARN que nous avons effectué afin de déterminer le patron d'expression du gène *hTDE1* et les résultats de cette dernière étude suggèrent qu'au moins deux membres de la famille TDE1/TMS sont surexprimés dans des tissus néoplasiques et pourraient avoir un rôle à jouer lors de la transformation cellulaire.

La localisation chromosomique d'un gène peut représenter une source d'informations importantes lorsque l'on cherche à déterminer son rôle dans l'apparition

ou l'évolution d'une maladie. En effet, il existe un certain nombre de pathologies phénotypiquement bien caractérisées, entre autres, certains cancers, que l'on est capable d'associer à des réarrangements chromosomiques particuliers mais dont on ignore le gène responsable. La découverte d'un nouveau gène dans l'une de ces régions en fait donc un candidat potentiel, et permet en retour d'élucider partiellement la fonction du gène en question. Nous avons localisé le gène *hTDE1* sur le chromosome 20 en région q13.1-13.3. Puisque nos études démontraient une surexpression de *hTDE1* dans des lésions tumorales, nous avons donc vérifié si la région où se localise le gène pouvait être amplifiée chez certaines tumeurs humaines. Dans le cancer du poumon, l'amplification de cette région n'a encore jamais été décrite. Cependant, l'analyse génétique d'un certain nombre de rhabdomyosarcomes de type embryonnaire, d'hépatoblastomes, de métastases de cancer du foie, de cancers pancréatiques, de cancers de l'ovaire, du sein et de la vessie démontre une amplification de cette région, pouvant suggérer un rôle de *hTDE1* dans l'apparition de chacune de ces tumeurs (96, 107, 148, 151, 161, 176, 177, 300, 337, 362). Cependant, aucune de ces études n'ayant évalué l'expression de *hTDE1* sur les tissus néoplasiques, il est par conséquent difficile de confirmer définitivement l'implication de *hTDE1* dans le processus de transformation à l'origine de ces tumeurs. Nous avons donc analysé par buvardage sur l'ARN messager, un certain nombre de lignées cellulaires dérivées de tumeurs du sein, qui présentaient ou ne présentaient pas une amplification en 20q. Nous n'avons détecté aucune différence dans les niveaux d'expression de *hTDE1*. Il nous a donc été impossible d'associer l'amplification génique à une augmentation d'expression du gène. Le nombre d'échantillons que nous avons analysés était cependant très limité, une étude plus extensive est donc nécessaire afin de déterminer si l'amplification génique représente le mécanisme par lequel *hTDE1* est

surexprimé dans certaines tumeurs. D'autres mécanismes, mis à part l'amplification génique, peuvent également engendrer une surexpression au niveau de l'ARN messager d'un gène. Par exemple, d'autres réarrangements chromosomiques comme les translocations, des altérations épigénétiques sur les régions régulatrices du gène, de même que toute mutation capable de modifier l'activité des différents facteurs contrôlant la transcription du gène, auront également pour conséquence une modification des niveaux d'expression génique. Les informations dont nous disposons ne sont pas suffisantes pour déterminer par quel mécanisme *hTDE1* pourrait être surexprimé dans les tumeurs *in vivo*.

8.4 Étude du rôle de *hTDE1* dans le processus de transformation

La surexpression du gène murin *TDE1* dans des tumeurs testiculaires que développent des souris transgéniques porteuses de PyLT, et la surexpression du gène murin *TMS-1* observée dans une tumeur développée au niveau du foie (128, 201), de même que la surexpression des gènes humains *hTDE1* et *TDE2L* (*FKSG84/TDE2*) dans les tumeurs pulmonaires (29, 267) suggèrent l'existence d'un lien entre les membres de la famille TDE1/TMS et le développement du cancer. Mais la nature de cette liaison reste à déterminer. Une approche intéressante pour élucider ce lien consiste à analyser les conséquences de la surexpression du gène *in vitro* sur le comportement de la cellule. Cette méthode expérimentale permet surtout de disséquer d'une manière indépendante, chacune des composantes de la transformation cellulaire dans un environnement contrôlé, différent de celui que l'on retrouve *in vivo*. Nous avons donc choisi d'introduire la séquence codante de *hTDE1* dans des fibroblastes de rat (Rat-1), par

l'intermédiaire d'un vecteur d'expression eucaryote, afin d'évaluer l'impact que pouvait avoir la surexpression du gène sur différents aspects de la physiologie cellulaire, communément modifiés lors de la progression tumorale. Nous avons choisi ce type particulier de fibroblastes car ils ont été maintes fois utilisés dans des essais de transformation cellulaire *in vitro*, par exemple dans des études de perte d'inhibition de contact, et représentaient donc un bon modèle expérimental (336, 368). Toutefois, dans certains cas, l'environnement dans lequel se développe une tumeur peut contribuer à l'aboutissement de la maladie (365). Pour cette raison, nous avons injecté les cellules Rat-1 qui surexprimaient *hTDE1*, dans des souris nues, et vérifié leur potentiel oncogénique dans un contexte *in vivo*, plus proche de celui que l'on retrouve lors de l'apparition spontanée d'une tumeur.

8.5 Activité transformante de *hTDE1* *in vitro*

En premier lieu nous avons évalué si la surexpression de la séquence codante du gène *hTDE1* pouvait influencer le processus de prolifération cellulaire qui représente une des composantes essentielles de la transformation (134). Par l'utilisation des mutants en N- et C-terminal de la séquence nous avons également voulu déterminer si ces portions de la protéine pouvaient jouer un rôle dans le processus de prolifération. La portion N-terminale de *hTDE1* contient une séquence signal dont la fonction n'est pas connue. La portion C-terminale contient plusieurs sites de phosphorylation qui pourraient jouer un rôle fonctionnel pour cette protéine.

Aucune différence de croissance n'a été décelée entre les cellules Rat-1 parentales, et les cellules Rat-1 qui exprimaient la pleine longueur de la séquence

codante de *hTDE1* ou les mutants de la protéine. Bien que l'augmentation de la prolifération cellulaire soit une des caractéristiques des cellules transformées en conditions physiologiques normales, certains tissus normaux prolifèrent plus rapidement que les cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple de certaines lésions inflammatoires bénignes, capables de croître jusqu'à vingt fois plus vite que les cellules cancéreuses dans certaines conditions (88, 106, 339). En effet, il est important de préciser que l'élévation du taux de croissance découle non seulement d'une perturbation dans le contrôle du cycle cellulaire, mais également du déséquilibre entre différents processus incluant la différenciation cellulaire et la mort cellulaire (58, 121, 242). Notre méthode expérimentale *in vitro* permet de déceler les cellules viables métaboliquement actives, mais n'évalue pas les autres paramètres susceptibles d'influencer le taux de prolifération cellulaire.

Parmi ces paramètres, on retrouve l'apoptose, une forme active de mort cellulaire programmée, déclenchée lors de la prolifération cellulaire. L'apoptose permet de maintenir le taux de croissance des cellules à une valeur compatible avec le bon fonctionnement de l'organisme et permet d'éliminer les cellules défectueuses comme le sont les cellules transformées (121). Or les cellules cancéreuses sont fréquemment résistantes à l'apoptose (179). Nous avons donc voulu déterminer si la surexpression de *hTDE1* pouvait altérer le comportement de la cellule face à l'apoptose, suite à l'administration d'étoposide et à la déplétion de sérum, deux conditions capables de déclencher ce type de mort cellulaire programmée chez certaines cellules normales. L'étoposide affecte l'activité de l'enzyme topoisomérase II, en stabilisant le complexe ADN-Topoisomérase II et en empêchant la réparation des cassures double brins sur l'ADN ce qui permet de déclencher l'apoptose par la voie intrinsèque ou mitochondriale

(375). Par l'utilisation d'étoposide de même que suite à la déplétion de sérum, il y a activation de la caspase-3 effectrice. Il est donc possible, en mesurant le taux d'activité de cette enzyme, de quantifier indirectement l'apoptose cellulaire. Le dosage d'activité de la caspase-3 de même que la coloration au Hoeschst, qui permet de différencier, par l'observation au microscope, les cellules vivantes des cellules en apoptose, nous ont permis de démontrer une diminution significative, chez les cellules exprimant la séquence pleine longueur de *hTDE1*, du taux d'apoptose. Suite à l'administration d'étoposide, l'analyse de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux a également permis de mettre en évidence une diminution de l'ampleur de la population sub-G1 chez les cellules qui surexpriment la séquence pleine longueur de *hTDE1*. Le pourcentage des cellules en sub-G1 est représentatif d'une fragmentation de l'ADN puisque l'ADN fragmenté sera perdu par la cellule et se traduira dans l'analyse du cycle cellulaire par l'apparition d'un pic en amont du pic G1. Pour confirmer que les cellules meurent bien par apoptose nous avons également, par migration électrophorétique de l'ADN cellulaire, visualisé l'apparition d'une échelle de fragments internucleosomiaux caractéristique de la mort cellulaire par apoptose. L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux sur une population mixte de cellules embryonnaires humaines de rein (HEK-293) qui surexpriment la séquence pleine longueur de *hTDE1* confirme les résultats obtenus dans les cellules Rat-1. Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de *hTDE1* confère une résistance aux cellules face à ce mécanisme de mort cellulaire programmée bien qu'il soit impossible à ce jour de déterminer comment cette résistance est accomplie. Cette nouvelle propriété acquise ne semble pas dépendante du type cellulaire dans lequel *hTDE1* est surexprimé. Nous avons démontré que cette résistance est caspase-3 dépendante. La cascade

d'évènements qui mènent à l'apoptose caspase-3 dépendante est très complexe, un grand nombre de composantes y participent. Nous ne pouvons à ce jour déterminer s'il existe une interaction directe entre la protéine hTDE1 et la protéase caspase-3 ou si hTDE1 interfère plutôt avec les molécules en amont de la cascade d'activation de la caspase-3 de même qu'avec des inhibiteurs de cette protéase, mais il est clair que hTDE1 induit une diminution de l'activité de la protéase. Une étude précédente effectuée sur un autre membre de la famille TDE1/TMS, le gène murin *AIGP1*, s'avère en contradiction avec nos résultats. Ici, l'expression de *AIGP1* semble promouvoir l'apoptose aussi bien *in vivo*, dans un contexte d'axotomie des nerfs périphériques chez la souris, qu'*in vitro*, suite à la transfection transitoire de la séquence codante du gène dans des cellules COS-7 (8). Plusieurs facteurs pourraient cependant expliquer cette différence substantielle entre les résultats que nous avons obtenus, et les données rapportées par Aoki et ses collègues. En premier lieu, les conditions expérimentales *in vitro* ne sont pas identiques. Nous avons analysé des clones exprimant *hTDE1* de manière stable et évalué le taux d'apoptose par un dosage de l'activité de la caspase-3 et une coloration au Hoeschst. Le groupe de Aoki a pour sa part vérifié la réponse à l'apoptose *in vitro* lors de transfections transitoires en vérifiant la fragmentation d'ADN par la technique TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling), qui permet de visualiser spécifiquement par marquage *in situ* les extrémités 3'-OH de l'ADN fragmenté. Cependant, ces différentes techniques étant couramment utilisées afin de vérifier l'avenue de l'apoptose, il est peu probable que la méthode expérimentale soit à l'origine d'une telle différence de résultats. *AIGP1* partage 77% d'homologie de séquence avec la protéine de hTDE1 et pourrait donc en représenter l'homologue humain. Mais la localisation tissulaire et cellulaire des deux membres de la famille

diffère. Alors que *hTDE1* semble s'exprimer de façon ubiquitaire dans les tissus et que la protéine se localise à la membrane plasmique, AIGP1 se localise dans le Golgi des cellules neuronales. Les auteurs démontrent une augmentation du taux d'apoptose en conditions normales de transfection transitoire du transcrit de AIGP1 dans des cellules COS-7. Dans les mêmes conditions, l'expression d'un autre membre de la famille TDE1/TMS, le gène de rat *TPO1*, n'induit pas d'apoptose, suggérant donc un rôle spécifique de AIGP1 qui pourrait expliquer par la même occasion la différence entre les résultats obtenus par le groupe de Aoki et le nôtre. En effet, le fait que hTDE1, AIGP1 et TPO1 appartiennent à la même famille de protéines n'exclue pas que chacune d'elles puissent jouer un rôle différent dans la cellule. Par exemple, la famille Bcl-2 comprend plusieurs membres caractérisés par la présence de domaines homologues. Parmi les différentes protéines appartenant à cette famille, certaines ont une activité anti-apoptotique alors que d'autres vont promouvoir l'apoptose. Au sein d'une même famille, il est par conséquent possible d'identifier des protéines homologues ayant une fonction opposée. De plus, les auteurs démontrent une induction de l'expression de *AIGP1* suite à un stress au ER-Golgi dans des cultures de neurones *in vitro*, de même que suite à l'axotomie de neurones périphériques *in vivo*, qui s'accompagne d'une augmentation du taux d'apoptose, suggérant donc des conditions particulières dans lesquelles la protéine pourrait agir en tant qu'agent pro-apoptotique. Cette dichotomie de fonction a déjà été décrite pour d'autres protéines connues. Par exemple, le facteur de transcription NF- κ B, auquel on attribue des propriétés anti-apoptotiques, peut, lorsque la cellule est soumise à des stimulations particulières, favoriser l'apoptose (13, 40). Il en est de même pour l'hormone parathyroïdienne (PTH), capable d'induire ou d'inhiber l'apoptose en fonction du statut de la cellule (53). D'après nos résultats, il est sans équivoque que l'expression

de *hTDE1* confère aux cellules une résistance à l'apoptose induite par l'étoposide et la déplétion de sérum, suggérant un mécanisme par lequel *hTDE1* pourrait favoriser le processus de transformation cellulaire. Il reste cependant possible qu'en conditions particulières, *hTDE1* ainsi que d'autres membres de la famille puissent agir de manières différentes, voir opposées.

Nous avons ensuite voulu déterminer si *hTDE1* pouvait immortaliser les cellules *in vitro*. En effet, alors que les cellules normales possèdent une durée de vie limitée, restreignant le nombre de divisions cellulaires qu'elles vont subir dans leur vie, les cellules tumorales se divisent indéfiniment. Nous avons donc comparé le taux d'immortalisation de fibroblastes embryonnaires de rat (REF) exprimant *hTDE1* ou l'antigène grand T du virus de polyome connu pour posséder des propriétés immortalisantes (274). Nous n'avons pu démontrer aucune différence significative dans le nombre de clones immortalisés par l'un ou l'autre des gènes. Mais le nombre de clones exprimant *hTDE1* que nous avons été capables d'isoler suite à la transfection, avant même d'en étudier l'immortalisation, était très réduit. Cette valeur est significativement inférieure au nombre de clones isolés suite à la transfection de PyLT (23 vs 111). Compte tenu de ce résultat et de la possibilité que présentent les fibroblastes embryonnaires de rat (REF) de s'immortaliser spontanément (264), il nous est par conséquent difficile de discriminer entre l'immortalisation spontanée et celle dépendante de l'expression de *hTDE1*. Il serait donc important d'augmenter l'échantillonnage afin de répondre à cette question.

L'inhibition de contact dépendante de la densité représente un des nombreux mécanismes mis en œuvre afin de maintenir l'intégrité des tissus et des organes dans l'organisme. Ce processus qui empêche les cellules de se diviser lorsque celles-ci entrent

en contact les unes avec les autres est dépendant de la présence d'un certain nombre de protéines membranaires, par exemple les cadhérines et la contactinhibin (353, 364, 120). Les cellules cancéreuses n'obéissent plus à cette règle, et sont donc capables de former une masse à l'intérieur de l'organisme. Il est possible de vérifier la perte de l'inhibition de contact par l'utilisation d'un test *in vitro*. En effet, contrairement aux cellules normales, les cellules transformées à confluence vont s'empiler les unes par-dessus les autres, formant ainsi des foyers de croissance caractéristiques de ce type d'expérience (338). Nous avons démontré que les cellules Rat-1 exprimant la séquence codante pleine longueur du gène *hTDE1* sont capables de former des foyers, à l'opposé des cellules parentales qui cessent de se diviser lorsqu'en contact les unes avec les autres. Puisque l'inhibition de contact dépend de l'interaction entre différentes protéines membranaires, à cause de sa localisation cellulaire, *hTDE1* pourrait être impliquée dans ce processus. Une surexpression de la protéine pourrait altérer l'équilibre des interactions entre cellules, se traduisant par une perte de l'inhibition de contact. Le mutant en C-terminal de la protéine localise correctement à la membrane plasmique, et les cellules qui l'expriment forment de robustes foyers. À l'opposé, le mutant en N-terminal de la protéine est incapable de se rendre à la membrane plasmique, et les cellules qui l'expriment ne forment pas de foyers, suggérant que la localisation de la protéine à la membrane est indispensable à la perte d'inhibition de contact.

Enfin, une des caractéristiques très importantes, lors de la transformation cellulaire, est la capacité des cellules de quitter leur lieu d'origine, de migrer et de s'établir à des sites secondaires dans l'organisme. Les métastases sont responsables du taux élevé de mortalité chez les patients atteints du cancer. Les cellules cancéreuses qui contribuent à la formation de métastases doivent être capables de migrer, donc de se

détacher de leur site d'origine, et d'envahir, c'est-à-dire de traverser, tous ces tissus qui constituent autant de barrières à leur migration (221). Nous avons vérifié l'avènement de ces deux conditions *in vitro*. Aucune différence entre les cellules parentales et les cellules exprimant la pleine longueur de *hTDE1* n'a pu être établie, lorsque nous avons évalué la vitesse à laquelle les cellules migraient à l'intérieur d'une brèche effectuée sur une monocouche de cellules (281, 307). Dans ces conditions, l'expression de *hTDE1* n'affecte donc ni l'adhésion cellulaire ni la capacité de migration des cellules. De manière semblable, l'expression de *hTDE1* n'altère pas la capacité des cellules à envahir une matrice de Matrigel. Le passage à travers la matrice de Matrigel requiert la dégradation d'un certain nombre de composantes comme le collagène IV, la laminine, l'entactine, l'héparan sulfate et les proteoglycans. La dégradation de ces mêmes éléments, que l'on retrouve dans la matrice extracellulaire *in vivo*, est nécessaire à l'avènement du processus d'invasion (185, 210, 228). *HTDE1* ne semble donc pas capable par elle-même d'augmenter le potentiel protéolytique des cellules et ne semble pas contribuer à augmenter le potentiel métastatique des cellules. Bien que la surexpression de la séquence pleine longueur de *hTDE1* n'interfère pas avec la capacité des cellules normales d'envahir le Matrigel, un changement dans la séquence de la protéine altère cette réponse. En effet, le mutant en C-terminal bloque la migration des cellules à travers la matrice. Il est donc difficile avec les résultats dont nous disposons, d'exclure de manière définitive un rôle de *hTDE1* dans le processus d'invasion.

Il est important de noter que l'apparition des métastases est un des processus les plus dépendants de l'environnement. Un grand nombre d'interactions homo- et hétérotypiques participent à la migration et à l'invasion des cellules métastatiques. Il est donc possible que notre méthode expérimentale ne reproduise pas les conditions

nécessaires à l'apparition du phénotype métastatique. La localisation cellulaire de la protéine à la membrane plasmique n'est pas en désaccord avec un rôle potentiel de *hTDE1* dans la migration et dans l'invasion. En effet la plupart des protéines qui participent à ces processus sont des molécules d'adhésion, des protéines extracellulaires et des molécules de signalisation principalement localisées à la membrane plasmique. Seules les cellules qui expriment les mutants en C-terminal de la protéine traversent moins facilement le Matrigel. Il nous est difficile pour l'instant d'expliquer les raisons de ce phénomène. Il se peut que les mutants en C-terminal interfèrent avec la signalisation normale des cellules et de cette façon inhibent la migration et l'invasion. Il est intéressant à noter que la plupart des foyers apparaissant chez les cellules qui expriment le mutant C-terminal sont plus compacts que les foyers apparaissant chez les cellules qui expriment la pleine longueur. La délétion de la portion de 112 acides aminés en C-terminale de la protéine semble donc affecter l'adhésion cellulaire. Le résultat serait intéressant à vérifier, par l'expérience de fermeture de brèche. Sans ce résultat, il est encore une fois difficile d'exclure un rôle de *hTDE1* dans la migration cellulaire. La région C-terminale d'un grand nombre de protéines membranaires est le siège d'interactions essentielles à leur fonction. C'est dans cette portion que se localisent des sites d'interactions pour des molécules de signalisation, des sites de multimérisation et de désensibilisation qui permettent de moduler l'activité de ces protéines membranaires (4, 93, 166, 170, 218, 262, 298). Parmi elles nombreuses sont celles qui jouent un rôle dans l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaires (123, 154, 203, 232, 293, 328, 330). Il est par conséquent tentant d'émettre l'hypothèse que la portion C-terminale cytoplasmique de la protéine *hTDE1*, pourrait également représenter le siège d'un certain nombre de sites importants dans la régulation de la fonction de la protéine.

Comme nous l'avons suggéré précédemment, cette région contient un grand nombre de sites potentiels de phosphorylation, renforçant l'hypothèse qu'il représente une portion de la protéine importante pour le contrôle de sa fonction.

8.6 Activité transformante de *hTDE1* *in vivo*

Les différentes expériences que nous avons effectuées *in vitro* nous ont permis d'analyser quelques-uns des effets de la surexpression de *hTDE1* sur certaines composantes de la transformation cellulaire. Mais comme nous l'avons souvent mentionné, l'environnement dans lequel se développe une tumeur joue un rôle important. Le vrai défi d'une cellule transformée est de survivre et de se multiplier à l'intérieur de l'organisme. Nous avons donc injecté par voie sous-cutanée des cellules exprimant la séquence codante pleine longueur de *hTDE1*, de même que différents contrôles négatifs, dans des souris nues et vérifié leur potentiel oncogénique *in vivo*. Toutes les souris ayant reçu des cellules exprimant la séquence de *hTDE1* ont généré des tumeurs. La plupart des souris ayant développé des tumeurs ont été sacrifiées quatre-vingts jours après l'injection, mais en conséquence de la taille considérable des tumeurs, quatre souris ont été sacrifiées cinquante jours après l'injection, ce qui démontre sans équivoque que *hTDE1* confère aux cellules des caractéristiques transformantes robustes *in vivo*. Nous avons également été capables d'obtenir des tumeurs par l'utilisation d'une séquence de fusion entre *hTDE1* et la protéine fluorescente verte (GFP). Bien que nous n'ayons analysé qu'un seul clone exprimant la protéine de fusion *hTDE1*-GFP, la présence de GFP ne semble pas affecter la fonctionnalité de la protéine et corrobore la localisation de la protéine à la membrane plasmique. Nous n'avons détecté aucune néo-

vascularisation sur les tumeurs, signal d'un déclenchement d'angiogenèse, pouvant conduire à l'apparition de métastases. Aucune masse tumorale à des sites secondaires n'a été retrouvée. Cependant, lorsque l'injection s'effectue par voie sous-cutanée, la tumeur qui en origine est généralement encapsulée, ne favorisant pas la migration cellulaire (180). L'injection par voie sanguine pourrait mieux nous informer du rôle de *hTDE1* dans le processus métastatique. Il serait également intéressant d'identifier les organes cibles où se développerait la tumeur. En effet, la plupart des organes dans lesquels une surexpression d'un des membres de la famille TDE1/TMS a été démontrée, comme les testicules, le poumon et les régions synaptiques des neurones, sont des environnements riches en facteurs hormonaux et de signalisation qui peuvent donc suggérer une fonction pour les protéines de la famille TDE1/TMS. Il est intéressant à noter que la contribution des membres de cette famille à la tumorigénèse semble plus importante dans un contexte *in vivo*. Lorsque nous avons analysé par buvardage à l'ARN l'expression du gène murin *TDE1* dans les tumeurs développées chez les souris MT-PVLT-10 versus l'expression du gène dans la lignée cellulaire D4 dérivée de ces mêmes tissus, le signal obtenu à partir des tumeurs *in vivo* était toujours plus intense. Les cellules D4 injectées dans des souris nues étaient capables d'induire la formation de tumeurs. Une deuxième lignée appelée T15 fut établie à partir de ces nouvelles tumeurs. Les cellules T15 exprimaient *TDE1* à des niveaux plus élevés que dans la lignée D4 et lorsque injectées dans des souris nues, induisaient la formation de tumeurs plus rapidement, suggérant que leur passage *in vivo* augmentait leur potentiel transformant. Comme nous l'avons démontré dans cette étude, l'expression du gène humain *hTDE1* confère aux cellules Rat-1 une capacité remarquable de former des tumeurs chez les souris nues. L'environnement auquel la cellule est exposée pourrait donc influencer

l'activité de ces protéines. Des conditions particulières, présentes spécifiquement dans un contexte *in vivo*, contribueraient à en augmenter les caractéristiques transformantes. Les membres de la famille TDE1/TMS ont une localisation membranaire, ce qui les rend susceptibles d'interagir avec toute molécule présente à la surface de la membrane; il est donc tentant de suggérer que leur activité dépende de manière significative de leur environnement, également en ce qui a trait à leur potentiel transformant.

8.7 Conclusion et perspectives

Suite à l'identification du gène murin *TDE1*, surexprimé dans les tumeurs testiculaires des souris transgéniques MT-PVLT-10, et par conséquent potentiellement impliqué dans le processus de tumorigénèse, nous étions intéressés à l'identification et à la caractérisation d'un possible homologue humain. À l'aide d'une sonde constituée de la séquence codante du gène murin, nous avons détecté quatre transcrits différents exprimés chez le placenta humain. Plusieurs autres gènes, aussi bien chez l'humain que chez d'autres espèces, homologues en séquences, ont été successivement identifiés, permettant de les regrouper à l'intérieur d'une seule et même famille. Nous avons choisi de poursuivre notre étude sur la séquence codante pleine longueur du gène *hTDE1*. L'analyse de séquence, de même que des résultats de localisation par l'expression d'une protéine de fusion avec la protéine fluorescente verte (GFP), nous ont permis d'établir que hTDE1 se localise à la membrane plasmique. La protéine possède probablement onze domaines transmembranaires, la portion N-terminale de la protéine est extracellulaire, elle est indispensable à sa translocation à la membrane, alors que la portion C-terminale est cytoplasmique. La séquence codante du gène s'exprime dans la

l'organisme. L'analyse d'expression comparative entre des tissus normaux et tumoraux démontre que *hTDE1* est surexprimé dans le cancer du poumon. Nos études *in vitro* démontrent qu'une surexpression du gène confère une perte d'inhibition de contact aux cellules, et les rend résistantes à l'apoptose induite par l'étoposide et la déplétion de sérum. Enfin, *in vivo*, les cellules exprimant *hTDE1* sont capables, lorsque injectées dans les souris nues, d'induire la formation de tumeurs. Nos résultats permettent donc de démontrer qu'une augmentation de l'expression de *hTDE1* aura comme conséquence la transformation cellulaire. La cellule acquiert une résistance à l'apoptose qui peut en partie être responsable du potentiel transformant de *hTDE1*.

Mais il nous est encore impossible d'attribuer une fonction au produit du gène *hTDE1*. Malgré l'apparition d'un certain nombre d'études portant sur d'autres membres de la famille, aucune de ces recherches ne répond à cette question. Compte tenu de la localisation cellulaire de la protéine à la membrane, on peut supposer que *hTDE1* pourrait faire le lien entre le microenvironnement entourant la cellule, et l'intérieur de celle-ci. Ce lien se ferait, à l'extérieur, par le biais d'un ligand soluble ou par l'interaction avec une protéine membranaire localisée sur une autre cellule. Enfin la transduction du signal à l'intérieur de la cellule pourrait impliquer l'interaction de la portion intracellulaire de *hTDE1* à des médiateurs moléculaires. Une étape importante dans la compréhension de la fonction de la protéine serait donc l'identification des partenaires protéiques de *hTDE1*. Les avancées technologiques de la protéomique, qui permettent d'établir des cartes d'interactions protéiques, couplées à l'utilisation de la technique du double hybride, pourraient nous permettre d'identifier des partenaires de *hTDE1* qui, s'ils appartenaient à des voies métaboliques connues, donneraient des indications quant à la fonction de la protéine.

Un autre aspect très important à approfondir serait de déterminer s'il existe une spécificité d'expression de *hTDE1* dans certains organes de même que dans des régions spécifiques des différents tissus. En effet, puisque nous soupçonnons *hTDE1* d'être capable d'interagir avec son environnement, sa fonction pourrait en partie dépendre de sa localisation tissulaire. Le même type de raisonnement peut s'appliquer quant à son rôle dans le processus de transformation. Une analyse plus approfondie des résultats de micro-puces à l'ARN disponibles dans la littérature pourrait déjà nous fournir une représentation plus complète du patron de distribution de l'expression du gène. Dans le même ordre d'idées, des expériences de localisation *in situ* et de microdissection au laser sur un échantillonnage important et varié sont également à envisager.

Enfin, dans un contexte *in vivo*, le développement d'une souris transgénique porteuse de la séquence codante de *hTDE1* pourrait nous apporter plusieurs informations importantes, par exemple l'ampleur du potentiel transformant du gène, l'existence éventuelle d'un tissu privilégié pour le développement des tumeurs et la capacité de développer des métastases. De plus, la possibilité de croiser la souris porteuse de *hTDE1* avec d'autres souris transgéniques, pourrait nous informer de l'existence d'une coopération dans l'activité transformante de *hTDE1* avec différentes protéines.

En conclusion, notre étude a permis de caractériser partiellement *hTDE1*, un membre d'une nouvelle famille de protéines. Bien que la fonction de la protéine reste encore inconnue, à cause de la présence d'un grand nombre de séquences homologues chez différents organismes, nous soupçonnons que *hTDE1* pourrait incarner un rôle central dans la physiologie cellulaire. Notre étude a également permis d'évaluer, tant *in vitro* qu'*in vivo*, que la surexpression de *hTDE1* pouvait contribuer à certains aspects du

processus de transformation cellulaire, et finalement induire la formation de tumeurs chez les souris nues. Loin d'être exhaustive, cette étude a tout de même contribué à augmenter nos connaissances au sujet de hTDE1, et permet de diriger de manière plus précise les recherches futures.

ANNEXES

Glycosylation de hTDE1:

Deux clones stables de cellules Rat-1 transfectés avec le vecteurs PGK, et exprimant la pleine longueur de hTDE1 en fusion avec la protéine fluorescente verte, ont été utilisés pour l'étude de glycosylation. Les clones PGK-hTDE1-GFP-16 et PGK-hTDE1-GFP-18 ont été traités pendant 48 heures à la tunicamycine (10 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 10 mM de Tris-Cl (pH 8.0), 200 nM de NaCl, 2 mM de EDTA, 1 mM de dithiothréitol (DTT), 0.5% de Nonidet P40 (NP-40), 0.5 mM de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1 µg/ml de leupétine, 1 µg/ml de pepstatine, 5 µg/ml de aprotinine, 10 mM de NaF, 0.4 mM de Na₃VO₄, 1.5 mM de Na₂MoO₄ et 1 mM de β-glycérophosphate. Les protéines ont ensuite été chargées et séparées sur un gel à 9% d'acrylamide avant de procéder à un immunobuvardage de type Western blot. Les bandes spécifiques ont été révélées par ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) par l'utilisation d'un anticorps primaire monoclonal de souris anti-GFP (JL-8, Clontech).

BIBLIOGRAPHIE DE L'INTRODUCTION ET DE LA DISCUSSION

BIBLIOGRAPHIE

1. **Adams, J. M.** 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17:2481-95.
2. **Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster.** 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318:533-8.
3. **Agalioti, T., G. Chen, and D. Thanos.** 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111:381-92.
4. **Alblas, J., I. van Etten, A. Khanum, and W. H. Moolenaar.** 1995. C-terminal truncation of the neurokinin-2 receptor causes enhanced and sustained agonist-induced signaling. Role of receptor phosphorylation in signal attenuation. *J Biol Chem* 270:8944-51.
5. **Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach, and J. C. Barrett.** 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13742-7.
6. **Alfonso, P., M. Catala, M. L. Rico-Morales, G. Durante-Rodriguez, E. Moro-Rodriguez, H. Fernandez-Garcia, J. M. Escribano, E. Alvarez-Fernandez, and E. Garcia-Poblete.** 2004. Proteomic analysis of lung biopsies: Differential protein expression profile between peritumoral and tumoral tissue. *Proteomics* 4:442-7.

7. **Amatschek, S., U. Koenig, H. Auer, P. Steinlein, M. Pacher, A. Gruenfelder, G. Dekan, S. Vogl, E. Kubista, K. H. Heider, C. Stratowa, M. Schreiber, and W. Sommergruber.** 2004. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* **64**:844-56.
8. **Aoki, S., Q. Su, H. Li, K. Nishikawa, K. Ayukawa, Y. Hara, K. Namikawa, S. Kiryu-Seo, H. Kiyama, and K. Wada.** 2002. Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress. *J Neurosci* **22**:10751-60.
9. **Aronheim, A., D. Engelberg, N. Li, N. al-Alawi, J. Schlessinger, and M. Karin.** 1994. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**:949-61.
10. **Ashkenazi, A.** 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**:420-30.
11. **Auerkari, E. I.** 2005. Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol*.
12. **Avantaggiati, M. L., V. Ogryzko, K. Gardner, A. Giordano, A. S. Levine, and K. Kelly.** 1997. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**:1175-84.
13. **Barkett, M., and T. D. Gilmore.** 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**:6910-24.
14. **Barletta, J. M., S. Rainier, and A. P. Feinberg.** 1997. Reversal of loss of imprinting in tumor cells by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **57**:48-50.

15. **Baron-Van Evercooren, A., N. A. Jensen, M. T. Wyss, F. Cuzin, M. Rassoulzadegan, J. M. Brucher, and H. Baron.** 1992. Transgenic mice expressing polyoma virus large T antigen in astrocytes develop severe dysmyelination of the central nervous system. *Lab Invest* **66**:39-53.
16. **Bautch, V. L.** 1989. Effects of polyoma virus oncogenes in transgenic mice. [Review] [32 refs]. *Molecular Biology & Medicine* **6**:309-17.
17. **Bautch, V. L., S. Toda, J. A. Hassell, and D. Hanahan.** 1987. Endothelial cell tumors develop in transgenic mice carrying polyoma virus middle T oncogene. *Cell* **51**:529-37.
18. **Beer, D. G., S. L. Kardia, C. C. Huang, T. J. Giordano, A. M. Levin, D. E. Misek, L. Lin, G. Chen, T. G. Gharib, D. G. Thomas, M. L. Lizyness, R. Kuick, S. Hayasaka, J. M. Taylor, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer, and S. Hanash.** 2002. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* **8**:816-24.
19. **Bernards, R., and R. A. Weinberg.** 2002. A progression puzzle. *Nature* **418**:823.
20. **Beug, H., P. Kahn, G. Doederlein, M. J. Hayman, and T. Graf.** 1985. Characterization of hematopoietic cells transformed in vitro by AEV-H, a v-erbB-containing avian erythroblastosis virus. *Haematol Blood Transfus* **29**:290-7.
21. **Bhattacharjee, A., W. G. Richards, J. Staunton, C. Li, S. Monti, P. Vasa, C. Ladd, J. Beheshti, R. Bueno, M. Gillette, M. Loda, G. Weber, E. J. Mark, E. S. Lander, W. Wong, B. E. Johnson, T. R. Golub, D. J. Sugarbaker, and M. Meyerson.** 2001. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression

- profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13790-5.
22. **Bird, A. P., and A. P. Wolffe.** 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**:451-4.
 23. **Blaikie, P. A., E. Fournier, S. M. Dilworth, D. Birnbaum, J. P. Borg, and B. Margolis.** 1997. The role of the Shc phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain and tyrosine phosphorylation sites in polyoma middle T antigen-mediated cell transformation. *J Biol Chem* **272**:20671-7.
 24. **Blobe, G. C., W. P. Schiemann, and H. F. Lodish.** 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* **342**:1350-8.
 25. **Blume-Jensen, P., and T. Hunter.** 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**:355-65.
 26. **Bogenrieder, T., and M. Herlyn.** 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**:6524-36.
 27. **Bond, J. A., M. F. Haughton, J. M. Rowson, P. J. Smith, V. Gire, D. Wynford-Thomas, and F. S. Wyllie.** 1999. Control of replicative life span in human cells: barriers to clonal expansion intermediate between M1 senescence and M2 crisis. *Mol Cell Biol* **19**:3103-14.
 28. **Bork, P., and E. V. Koonin.** 1998. Predicting functions from protein sequences--where are the bottlenecks? *Nat Genet* **18**:313-8.
 29. **Bossolasco, M., M. Lebel, N. Lemieux, and A. M. Mes-Masson.** 1999. The human TDE gene homologue: localization to 20q13.1-13.3 and variable expression in human tumor cell lines and tissue. *Mol Carcinog* **26**:189-200.

30. **Boutin, J. A.** 1997. Myristoylation. *Cell Signal* **9**:15-35.
31. **Bright, R. K., C. D. Vocke, M. R. Emmert-Buck, P. H. Duray, D. Solomon, P. Fetsch, J. S. Rhim, W. M. Linehan, and S. L. Topalian.** 1997. Generation and genetic characterization of immortal human prostate epithelial cell lines derived from primary cancer specimens. *Cancer Res* **57**:995-1002.
32. **Brinster, R. L., H. Y. Chen, A. Messing, T. van Dyke, A. J. Levine, and R. D. Palmiter.** 1984. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* **37**:367-79.
33. **Brodsky, J. L., and J. M. Pipas.** 1998. Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *J Virol* **72**:5329-34.
34. **Brown, R., and G. Strathdee.** 2002. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol Med* **8**:S43-8.
35. **Bryan, T. M., A. Englezou, J. Gupta, S. Bacchetti, and R. R. Reddel.** 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* **14**:4240-8.
36. **Bryan, T. M., L. Marusic, S. Bacchetti, M. Namba, and R. R. Reddel.** 1997. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet* **6**:921-6.
37. **Burkitt, D. P.** 1983. The discovery of Burkitt's lymphoma. *Cancer* **51**:1777-86.
38. **Butel, J. S.** 2000. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* **21**:405-26.
39. **Cameron, E. E., K. E. Bachman, S. Myohanen, J. G. Herman, and S. B. Baylin.** 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**:103-7.

40. **Campbell, K. J., N. R. Chapman, and N. D. Perkins.** 2001. UV stimulation induces nuclear factor kappaB (NF-kappaB) DNA-binding activity but not transcriptional activation. *Biochem Soc Trans* **29**:688-91.
41. **Campbell, K. S., E. Ogris, B. Burke, W. Su, K. R. Auger, B. J. Druker, B. S. Schaffhausen, T. M. Roberts, and D. C. Pallas.** 1994. Polyoma middle tumor antigen interacts with SHC protein via the NPTY (Asn-Pro-Thr-Tyr) motif in middle tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6344-8.
42. **Campisi, J.** 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* **14**:183-8.
43. **Campisi, J.** 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* **11**:S27-31.
44. **Campisi, J.** 2001. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol* **36**:607-18.
45. **Campisi, J.** 1996. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* **84**:497-500.
46. **Campisi, J.** 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**:513-22.
47. **Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed.** 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**:1318-21.
48. **Caspari, T.** 2000. How to activate p53. *Curr Biol* **10**:R315-7.
49. **Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips, W. F. Benedict, R. Godbout, B. L. Gallie, A. L. Murphree, L. C. Strong, and R. L. White.** 1983. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**:779-84.

50. **Chalifour, L. E., M. L. Gomes, N. S. Wang, and A. M. Mes-Masson.** 1990. Polyomavirus large T-antigen expression in heart of transgenic mice causes cardiomyopathy. *Oncogene* **5**:1719-26.
51. **Chalifour, L. E., A. M. Mes-Masson, M. L. Gomes, and N. S. Wang.** 1992. Testicular adenoma and seminal vesicle engorgement in polyomavirus large-T antigen transgenic mice. *Molecular Carcinogenesis* **5**:178-89.
52. **Chang, C., and Z. Werb.** 2001. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* **11**:S37-43.
53. **Chen, H. L., B. Demiralp, A. Schneider, A. J. Koh, C. Silve, C. Y. Wang, and L. K. McCauley.** 2002. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein exert both pro- and anti-apoptotic effects in mesenchymal cells. *J Biol Chem* **277**:19374-81.
54. **Cheng, S. H., R. Harvey, P. C. Espino, K. Semba, T. Yamamoto, K. Toyoshima, and A. E. Smith.** 1988. Peptide antibodies to the human c-fyn gene product demonstrate pp59c-fyn is capable of complex formation with the middle-T antigen of polyomavirus. *Embo J* **7**:3845-55.
55. **Cho, S., Y. Tian, and T. L. Benjamin.** 2001. Binding of p300/CBP co-activators by polyoma large T antigen. *J Biol Chem* **276**:33533-9.
56. **Cohen, J. J.** 1993. Apoptosis. *Immunol Today* **14**:126-30.
57. **Cong, Y. S., W. E. Wright, and J. W. Shay.** 2002. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:407-25, table of contents.
58. **Corn, P. G., and W. S. El-Deiry.** 2002. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays* **24**:83-90.

59. **Counter, C. M., A. A. Avilion, C. E. LeFeuvre, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley, and S. Bacchetti.** 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* **11**:1921-9.
60. **Courtneidge, S. A., and A. Heber.** 1987. An 81 kd protein complexed with middle T antigen and pp60c-src: a possible phosphatidylinositol kinase. *Cell* **50**:1031-7.
61. **Courtneidge, S. A., and A. E. Smith.** 1983. Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* **303**:435-9.
62. **Coussens, L. M., and Z. Werb.** 1996. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* **3**:895-904.
63. **Coutts, A. S., and N. B. La Thangue.** 2005. The p53 response: emerging levels of co-factor complexity. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:778-85.
64. **Crawford, H. C., B. M. Fingleton, L. A. Rudolph-Owen, K. J. Goss, B. Rubinfeld, P. Polakis, and L. M. Matrisian.** 1999. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* **18**:2883-91.
65. **Cui, H., I. L. Horon, R. Ohlsson, S. R. Hamilton, and A. P. Feinberg.** 1998. Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Nat Med* **4**:1276-80.
66. **Cyr, D. M., T. Langer, and M. G. Douglas.** 1994. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* **19**:176-81.

67. **Danial, N. N., and S. J. Korsmeyer.** 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116:205-19.
68. **Datta, S. R., A. Brunet, and M. E. Greenberg.** 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905-27.
69. **de Jong, J. S., P. J. van Diest, P. van der Valk, and J. P. Baak.** 1998. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol* 184:44-52.
70. **de Jong, J. S., P. J. van Diest, P. van der Valk, and J. P. Baak.** 1998. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 184:53-7.
71. **de Lange, T.** 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21:532-40.
72. **Deveraux, Q. L., and J. C. Reed.** 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-52.
73. **Di Marco, E., J. H. Pierce, T. P. Fleming, M. H. Kraus, C. J. Molloy, S. A. Aaronson, and P. P. Di Fiore.** 1989. Autocrine interaction between TGF alpha and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 4:831-8.
74. **Dias, S., K. Hattori, B. Heissig, Z. Zhu, Y. Wu, L. Witte, D. J. Hicklin, M. Tateno, P. Bohlen, M. A. Moore, and S. Rafii.** 2001. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10857-62.

75. **Dilworth, S. M., H. A. Hansson, C. Darnfors, G. Bjursell, C. H. Streuli, and B. E. Griffin.** 1986. Subcellular localisation of the middle and large T-antigens of polyoma virus. *Embo J* **5**:491-9.
76. **Dimri, G. P., K. Itahana, M. Acosta, and J. Campisi.** 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* **20**:273-85.
77. **Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al.** 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9363-7.
78. **Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, Jr., J. S. Butel, and A. Bradley.** 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**:215-21.
79. **Downward, J.** 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**:262-7.
80. **Duesberg, P. H., and P. K. Vogt.** 1970. Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**:1673-80.
81. **Dyson, N., P. Guida, K. Munger, and E. Harlow.** 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* **66**:6893-902.
82. **Egeblad, M., and Z. Werb.** 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**:161-74.

83. **El Far, O., and H. Betz.** 2002. G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem J* **365**:329-36.
84. **Elbein, A. D.** 1987. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu Rev Biochem* **56**:497-534.
85. **Eliceiri, B. P., and D. A. Cheresh.** 1998. The role of alphav integrins during angiogenesis. *Mol Med* **4**:741-50.
86. **Esteller, M.** 2005. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:629-56.
87. **Evan, G. I., and K. H. Vousden.** 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**:342-8.
88. **Fabrikant, J. I., and J. Cherry.** 1969. The kinetics of cellular proliferation in normal and malignant tissues. V. Analysis of labeling indices and potential tissue doubling times in human tumor cell populations. *J Surg Oncol* **1**:23-47.
89. **Fambrough, D., K. McClure, A. Kazlauskas, and E. S. Lander.** 1999. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* **97**:727-41.
90. **Fang, J., Y. Shing, D. Wiederschain, L. Yan, C. Butterfield, G. Jackson, J. Harper, G. Tamvakopoulos, and M. A. Moses.** 2000. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3884-9.
91. **Fearon, E. R., and B. Vogelstein.** 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759-67.
92. **Feinberg, A. P., and B. Vogelstein.** 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**:89-92.

93. **Ferguson, S. S.** 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**:1-24.
94. **Ferrara, N.** 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**:1-30.
95. **Ferrara, N., and W. J. Henzel.** 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**:851-8.
96. **Fletcher, J. A., H. P. Kozakewich, K. Pavelka, H. E. Grier, R. C. Shamberger, B. Korf, and C. C. Morton.** 1991. Consistent cytogenetic aberrations in hepatoblastoma: a common pathway of genetic alterations in embryonal liver and skeletal muscle malignancies? *Genes, Chromosomes & Cancer* **3**:37-43.
97. **Folkman, J.** 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**:1182-6.
98. **Folkman, J.** 1976. The vascularization of tumors. *Sci Am* **234**:58-64, 70-3.
99. **Folkman, J., and M. Hochberg.** 1973. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* **138**:745-53.
100. **Folkman, J., and Y. Shing.** 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**:10931-4.
101. **Foster, S. A., D. J. Wong, M. T. Barrett, and D. A. Galloway.** 1998. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol Cell Biol* **18**:1793-801.
102. **Francke, B., and W. Eckhart.** 1973. Polyoma gene function required for viral DNA synthesis. *Virology* **55**:127-35.

103. **Franklin, A. A., M. F. Kubik, M. N. Uittenbogaard, A. Brauweiler, P. Utaisincharoen, M. A. Matthews, W. S. Dynan, J. P. Hoeffler, and J. K. Nyborg.** 1993. Transactivation by the human T-cell leukemia virus Tax protein is mediated through enhanced binding of activating transcription factor-2 (ATF-2) ATF-2 response and cAMP element-binding protein (CREB). *J Biol Chem* **268**:21225-31.
104. **Franklin, J., J. Hislop, A. Flynn, and C. A. McArdle.** 2003. Signalling and anti-proliferative effects mediated by gonadotrophin-releasing hormone receptors after expression in prostate cancer cells using recombinant adenovirus. *J Endocrinol* **176**:275-84.
105. **Freund, R., R. T. Bronson, and T. L. Benjamin.** 1992. Separation of immortalization from tumor induction with polyoma large T mutants that fail to bind the retinoblastoma gene product. *Oncogene* **7**:1979-87.
106. **Fukuda, K., T. Iwasaka, T. Hachisuga, H. Sugimori, H. Tsugitomi, and F. Mutoh.** 1990. Immunocytochemical detection of S-phase cells in normal and neoplastic cervical epithelium by anti-BrdU monoclonal antibody. *Anal Quant Cytol Histol* **12**:135-8.
107. **Fukushige, S., F. M. Waldman, M. Kimura, T. Abe, T. Furukawa, M. Sunamura, M. Kobari, and A. Horii.** 1997. Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **19**:161-9.
108. **Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway.** 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA

replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**:2090-100.

109. **Gagnon, J., S. Shaker, M. Primeau, A. Hurtubise, and R. L. Momparler.** 2003. Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells. *Anticancer Drugs* **14**:193-202.
110. **Garber, M. E., O. G. Troyanskaya, K. Schluens, S. Petersen, Z. Thaessler, M. Pacyna-Gengelbach, M. van de Rijn, G. D. Rosen, C. M. Perou, R. I. Whyte, R. B. Altman, P. O. Brown, D. Botstein, and I. Petersen.** 2001. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13784-9.
111. **Gatza, M. L., C. Chandhasin, R. I. Duce, and S. J. Marriott.** 2005. Impact of transforming viruses on cellular mutagenesis, genome stability, and cellular transformation. *Environ Mol Mutagen* **45**:304-25.
112. **Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti.** 1999. Integrin signaling. *Science* **285**:1028-32.
113. **Gimbrone, M. A., Jr., R. S. Cotran, S. B. Leapman, and J. Folkman.** 1974. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* **52**:413-27.
114. **Gimbrone, M. A., Jr., S. B. Leapman, R. S. Cotran, and J. Folkman.** 1972. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* **136**:261-76.

115. **Gimpl, G., K. Burger, and F. Fahrenholz.** 2002. A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem Sci* **27**:596-9.
116. **Gjorup, O. V., P. E. Rose, P. S. Holman, B. J. Bockus, and B. S. Schaffhausen.** 1994. Protein domains connect cell cycle stimulation directly to initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12125-9.
117. **Glover, H. R., C. E. Brewster, and S. M. Dilworth.** 1999. Association between src-kinases and the polyoma virus oncogene middle T-antigen requires PP2A and a specific sequence motif. *Oncogene* **18**:4364-70.
118. **Gottifredi, V., A. Peschiaroli, G. M. Fimia, and R. Maione.** 1999. p53-independent apoptosis induced by muscle differentiation stimuli in polyomavirus large T-expressing myoblasts. *J Cell Sci* **112 (Pt 14)**:2397-407.
119. **Grady, W. M., L. L. Myeroff, S. E. Swinler, A. Rajput, S. Thiagalingam, J. D. Lutterbaugh, A. Neumann, M. G. Brattain, J. Chang, S. J. Kim, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, J. K. Willson, and S. Markowitz.** 1999. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* **59**:320-4.
120. **Grazia Lampugnani, M., A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T. O. Daniel, and E. Dejana.** 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* **161**:793-804.
121. **Green, D. R., and G. I. Evan.** 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**:19-30.

122. **Green, D. R., and J. C. Reed.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**:1309-12.
123. **Greenwood, J., C. L. Amos, C. E. Walters, P. O. Couraud, R. Lyck, B. Engelhardt, and P. Adamson.** 2003. Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. *J Immunol* **171**:2099-108.
124. **Greger, V., E. Passarge, W. Hopping, E. Messmer, and B. Horsthemke.** 1989. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* **83**:155-8.
125. **Griep, A. E., T. Kuwabara, E. J. Lee, and H. Westphal.** 1989. Perturbed development of the mouse lens by polyomavirus large T antigen does not lead to tumor formation. *Genes & Development* **3**:1075-85.
126. **Griep, A. E., and H. Westphal.** 1990. Differentiation versus proliferation of transgenic mouse lens cells expressing polyoma large T antigen: evidence for regulation by an endogenous growth factor. *New Biol* **2**:727-38.
127. **Gross, L.** 1953. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **83**:414-21.
128. **Grossman, T. R., J. M. Luque, and N. Nelson.** 2000. Identification of a ubiquitous family of membrane proteins and their expression in mouse brain. *J Exp Biol* **203 Pt 3**:447-57.
129. **Gruss, C., and M. Herlyn.** 2001. Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr Opin Oncol* **13**:117-23.

130. **Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann, and K. Rajewsky.** 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**:103-6.
131. **Hahn, W. C., C. M. Counter, A. S. Lundberg, R. L. Beijersbergen, M. W. Brooks, and R. A. Weinberg.** 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**:464-8.
132. **Hanahan, D.** 1985. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* **315**:115-22.
133. **Hanahan, D., and J. Folkman.** 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**:353-64.
134. **Hanahan, D., and R. A. Weinberg.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
135. **Hara, E., R. Smith, D. Parry, H. Tahara, S. Stone, and G. Peters.** 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* **16**:859-67.
136. **Harley, C. B., A. B. Futcher, and C. W. Greider.** 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**:458-60.
137. **Harper, J. W., and P. D. Adams.** 2001. Cyclin-dependent kinases. *Chem Rev* **101**:2511-26.
138. **Harris, H., O. J. Miller, G. Klein, P. Worst, and T. Tachibana.** 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* **223**:363-8.
139. **Hartwell, L. H., and T. A. Weinert.** 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**:629-34.

140. **Harvey, M., A. T. Sands, R. S. Weiss, M. E. Hegi, R. W. Wiseman, P. Pantazis, B. C. Giovanella, M. A. Tainsky, A. Bradley, and L. A. Donehower.** 1993. In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* **8**:2457-67.
141. **Hayflick, L.** 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**:614-36.
142. **Hayflick, L., and P. S. Moorhead.** 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**:585-621.
143. **Herlyn, M., and S. B. Malkowicz.** 1991. Regulatory pathways in tumor growth and invasion. *Lab Invest* **65**:262-71.
144. **Herman, J. G.** 1999. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* **9**:359-67.
145. **Herman, J. G., and S. B. Baylin.** 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* **349**:2042-54.
146. **Hersey, P., and X. D. Zhang.** 2003. Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J Cell Physiol* **196**:9-18.
147. **Hershko, T., M. Chaussepied, M. Oren, and D. Ginsberg.** 2005. Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* **12**:377-83.
148. **Hidaka, S., T. Yasutake, H. Takeshita, M. Kondo, T. Tsuji, A. Nanashima, T. Sawai, H. Yamaguchi, T. Nakagoe, H. Ayabe, and Y. Tagawa.** 2000. Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis. *Clin Cancer Res* **6**:2712-7.

149. **Hoffman, A. G., R. C. Burghardt, R. Tilley, and N. Auersperg.** 1993. An in vitro model of ovarian epithelial carcinogenesis: changes in cell-cell communication and adhesion occurring during neoplastic progression. *Int J Cancer* **54**:828-38.
150. **Holash, J., P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos, and S. J. Wiegand.** 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**:1994-8.
151. **Holzmann, K., H. Kohlhammer, C. Schwaenen, S. Wessendorf, H. A. Kestler, A. Schwoerer, B. Rau, B. Radlwimmer, H. Dohner, P. Lichter, T. Gress, and M. Bentz.** 2004. Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. *Cancer Res* **64**:4428-33.
152. **Horak, P., D. Pils, G. Haller, I. Pribill, M. Roessler, S. Tomek, R. Horvat, R. Zeillinger, C. Zielinski, and M. Krainer.** 2005. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* **3**:335-43.
153. **Hsieh, J. K., D. Yap, D. J. O'Connor, V. Fogal, L. Fallis, F. Chan, S. Zhong, and X. Lu.** 2002. Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **22**:78-93.
154. **Huynh-Do, U., C. Vindis, H. Liu, D. P. Cerretti, J. T. McGrew, M. Enriquez, J. Chen, and T. O. Daniel.** 2002. Ephrin-B1 transduces signals to activate

- integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. *J Cell Sci* **115**:3073-81.
155. **Hwang, B. J., J. M. Ford, P. C. Hanawalt, and G. Chu.** 1999. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:424-8.
156. **Hyde, R. J., C. E. Cass, J. D. Young, and S. A. Baldwin.** 2001. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol* **18**:53-63.
157. **Hynes, R. O.** 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**:673-87.
158. **Ichaso, N., and S. M. Dilworth.** 2001. Cell transformation by the middle T-antigen of polyoma virus. *Oncogene* **20**:7908-16.
159. **Itahana, K., J. Campisi, and G. P. Dimri.** 2004. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* **5**:1-10.
160. **Itakura, J., T. Ishiwata, B. Shen, M. Kornmann, and M. Korc.** 2000. Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer* **85**:27-34.
161. **Iwabuchi, H., M. Sakamoto, H. Sakunaga, Y. Y. Ma, M. L. Carcangiu, D. Pinkel, T. L. Yang-Feng, and J. W. Gray.** 1995. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* **55**:6172-80.
162. **Jaattela, M.** 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* **23**:2746-56.

163. **Jacks, T., A. Fazeli, E. M. Schmitt, R. T. Bronson, M. A. Goodell, and R. A. Weinberg.** 1992. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**:295-300.
164. **Jackson-Grusby, L.** 2002. Modeling cancer in mice. *Oncogene* **21**:5504-14.
165. **Jeffers, M., L. Schmidt, N. Nakaigawa, C. P. Webb, G. Weirich, T. Kishida, B. Zbar, and G. F. Vande Woude.** 1997. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:11445-50.
166. **Jenke, M., A. Sanchez, F. Monje, W. Stuhmer, R. M. Weseloh, and L. A. Pardo.** 2003. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *Embo J* **22**:395-403.
167. **Jenkins, N., R. B. Parekh, and D. C. James.** 1996. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* **14**:975-81.
168. **Jensen, N. A., A. Baron-Van Evercooren, M. G. Mattei, E. Galiana, C. Guron, M. Pincon-Raymond, H. Baron, P. Rouget, F. Cuzin, and M. Rassoulzadegan.** 1989. Neurological disorder in transgenic mice that express the large T antigen of polyoma virus in the nervous system. *Molecular Biology & Medicine* **6**:493-500.
169. **Jenuwein, T., and C. D. Allis.** 2001. Translating the histone code. *Science* **293**:1074-80.
170. **Jia, J., C. Tong, and J. Jiang.** 2003. Smoothed transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes Dev* **17**:2709-20.

171. **Johnson, D. R., R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll, and J. I. Gordon.** 1994. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu Rev Biochem* **63**:869-914.
172. **Johnson, J. P.** 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **18**:345-57.
173. **Jones, P. A., and S. B. Baylin.** 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**:415-28.
174. **Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward, and A. W. Burgess.** 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**:31-53.
175. **Jursky, F., S. Tamura, A. Tamura, S. Mandiyan, H. Nelson, and N. Nelson.** 1994. Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J Exp Biol* **196**:283-95.
176. **Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, G. Citro, G. Sauter, S. DeVries, R. Kerschmann, P. Carroll, and F. Waldman.** 1995. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **12**:213-9.
177. **Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, J. Piper, M. Tanner, T. Stokke, L. Chen, H. S. Smith, D. Pinkel, J. W. Gray, and F. M. Waldman.** 1994. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:2156-60.
178. **Karin, M., and A. Lin.** 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**:221-7.

179. **Kaufmann, S. H., and D. L. Vaux.** 2003. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* **22**:7414-30.
180. **Kerbel, R. S., I. Cornil, and D. Theodorescu.** 1991. Importance of orthotopic transplantation procedures in assessing the effects of transfected genes on human tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **10**:201-15.
181. **Khandjian, E. W., and S. Tremblay.** 1992. Phosphorylation of the retinoblastoma protein is modulated in mouse kidney cells infected with polyomavirus. *Oncogene* **7**:909-17.
182. **Kim, K. J., B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips, and N. Ferrara.** 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**:841-4.
183. **Kim Sh, S. H., P. Kaminker, and J. Campisi.** 2002. Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* **21**:503-11.
184. **Kitada, S., I. M. Pedersen, A. D. Schimmer, and J. C. Reed.** 2002. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* **21**:3459-74.
185. **Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie, and G. R. Martin.** 1986. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**:312-8.
186. **Knudson, A. G., Jr.** 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**:820-3.
187. **Kohler, M., T. Bauknecht, M. Grimm, G. Birmelin, F. Kommoss, and E. Wagner.** 1992. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer* **28A**:1432-7.

188. **Kornbluth, S., M. Sudol, and H. Hanafusa.** 1987. Association of the polyomavirus middle-T antigen with c-yes protein. *Nature* **325**:171-3.
189. **Korpelainen, E. I., and K. Alitalo.** 1998. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **10**:159-64.
190. **Kozak, M.** 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. [Review] [54 refs]. *Nucleic Acids Research* **15**:8125-48.
191. **Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez, and J. Campisi.** 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12072-7.
192. **Krueger, W. H., G. E. Gonye, D. L. Madison, K. E. Murray, M. Kumar, N. Spoerel, and S. E. Pfeiffer.** 1997. TPO1, a member of a novel protein family, is developmentally regulated in cultured oligodendrocytes. *J Neurochem* **69**:1343-55.
193. **Kypta, R. M., A. Hemming, and S. A. Courtneidge.** 1988. Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *Embo J* **7**:3837-44.
194. **Laiho, M., J. A. DeCaprio, J. W. Ludlow, D. M. Livingston, and J. Massague.** 1990. Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* **62**:175-85.
195. **Laird, P. W., and R. Jaenisch.** 1996. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* **30**:441-64.
196. **Land, H., L. F. Parada, and R. A. Weinberg.** 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**:596-602.

197. **Larose, A., N. Dyson, M. Sullivan, E. Harlow, and M. Bastin.** 1991. Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J Virol* **65**:2308-13.
198. **Larose, A., L. St-Onge, and M. Bastin.** 1990. Mutations in polyomavirus large T affecting immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virology* **176**:98-105.
199. **Lebel, M., R. Bertrand, and A. M. Mes-Masson.** 1996. Decreased Fas antigen receptor expression in testicular tumor cell lines derived from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *Oncogene* **12**:1127-35.
200. **Lebel, M., and A. M. Mes-Masson.** 1994. Establishment and characterization of testicular cell lines from MT-PVLT-10 transgenic mice. *Experimental Cell Research* **213**:12-9.
201. **Lebel, M., and A. M. Mes-Masson.** 1994. Sequence analysis of a novel cDNA which is overexpressed in testicular tumors from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *DNA Sequence* **5**:31-9.
202. **Lebel, M., M. Webster, W. J. Muller, A. Royal, J. Gauthier, and A. M. Mes-Masson.** 1995. Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19 promoter develop bronchiolar papillary tumors with progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth & Differentiation* **6**:1591-600.
203. **Lehti, K., H. Valtanen, S. Wickstrom, J. Lohi, and J. Keski-Oja.** 2000. Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **275**:15006-13.

204. **Lemoine, F. J., and S. J. Marriott.** 2001. Accelerated G(1) phase progression induced by the human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) Tax oncoprotein. *J Biol Chem* **276**:31851-7.
205. **Lewandoski, M.** 2001. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**:743-55.
206. **Li, G., and M. Herlyn.** 2000. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* **6**:163-9.
207. **Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn.** 2001. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**:3819-25.
208. **Liotta, L. A., and E. C. Kohn.** 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**:375-9.
209. **Liotta, L. A., M. G. Saidel, and J. Kleinerman.** 1976. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* **36**:889-94.
210. **Liotta, L. A., U. P. Thorgeirsson, and S. Garbisa.** 1982. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* **1**:277-88.
211. **Liotta, L. A., K. Tryggvason, S. Garbisa, I. Hart, C. M. Foltz, and S. Shafie.** 1980. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**:67-8.
212. **Lokker, N. A., C. M. Sullivan, S. J. Hollenbach, M. A. Israel, and N. A. Giese.** 2002. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel

- PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* **62**:3729-35.
213. **Lukashev, M. E., and Z. Werb.** 1998. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* **8**:437-41.
214. **Lundberg, A. S., and R. A. Weinberg.** 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* **35**:1886-94.
215. **Lynch, H. T., and A. de la Chapelle.** 1999. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* **36**:801-18.
216. **Macaluso, M., M. G. Paggi, and A. Giordano.** 2003. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. *Oncogene* **22**:6472-8.
217. **Macleod, K. F., and T. Jacks.** 1999. Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* **187**:43-60.
218. **Magnino, F., K. Schmidt, L. Mery, and J. F. Dufour.** 2001. Rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform 2 interacts with itself in its C-terminal portion and upstream of the first transmembrane domain. *Eur J Biochem* **268**:5981-8.
219. **Maley, C. C., P. C. Galipeau, X. Li, C. A. Sanchez, T. G. Paulson, and B. J. Reid.** 2004. Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus. *Cancer Res* **64**:3414-27.
220. **Manjanatha, M. G., J. B. Chen, J. G. Shaddock, Jr., A. J. Harris, S. D. Shelton, and D. A. Casciano.** 1996. Molecular analysis of lacI mutations in Rat2 cells exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: evidence for DNA sequence and DNA strand biases for mutation. *Mutat Res* **372**:53-64.
221. **Mareel, M., and A. Leroy.** 2003. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* **83**:337-76.

222. **Martinez, L. A., Y. Chen, A. Pavone, S. M. Fischer, and C. J. Conti.** 2000. Deregulated expression of cyclin D1 overrides antimitogenic signals. *Oncogene* **19**:315-22.
223. **Masood, R., J. Cai, T. Zheng, D. L. Smith, D. R. Hinton, and P. S. Gill.** 2001. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* **98**:1904-13.
224. **Maxwell, M., S. P. Naber, H. J. Wolfe, T. Galanopoulos, E. T. Hedley-Whyte, P. M. Black, and H. N. Antoniades.** 1990. Coexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes by primary human astrocytomas may contribute to their development and maintenance. *J Clin Invest* **86**:131-40.
225. **McGrath, J., and D. Solter.** 1984. Maternal Thp lethality in the mouse is a nuclear, not cytoplasmic, defect. *Nature* **308**:550-1.
226. **McLaughlin, S., and A. Aderem.** 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* **20**:272-6.
227. **Medema, R. H., and J. L. Bos.** 1993. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* **4**:615-61.
228. **Melchiori, A., A. Albini, J. M. Ray, and W. G. Stetler-Stevenson.** 1992. Inhibition of tumor cell invasion by a highly conserved peptide sequence from the matrix metalloproteinase enzyme prosegment. *Cancer Res* **52**:2353-6.
229. **Miyake, H., T. Suzuki, H. Hirai, and M. Yoshida.** 1999. Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome. *Virology* **253**:155-61.

230. **Miyashita, T., and J. C. Reed.** 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**:293-9.
231. **Momparler, R. L.** 2003. Cancer epigenetics. *Oncogene* **22**:6479-83.
232. **Morgan, M. R., G. J. Thomas, A. Russell, I. R. Hart, and J. F. Marshall.** 2004. The Integrin Cytoplasmic-tail Motif EKQKVDLSTDC Is Sufficient to Promote Tumor Cell Invasion Mediated by Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9. *J Biol Chem* **279**:26533-26539.
233. **Muegge, K., H. Young, F. Ruscetti, and J. Mikovits.** 2003. Epigenetic control during lymphoid development and immune responses: aberrant regulation, viruses, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* **983**:55-70.
234. **Muller, M., S. Wilder, D. Bannasch, D. Israeli, K. Lehlbach, M. Li-Weber, S. L. Friedman, P. R. Galle, W. Stremmel, M. Oren, and P. H. Krammer.** 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* **188**:2033-45.
235. **Nakano, K., and K. H. Vousden.** 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**:683-94.
236. **Nemethova, M., and E. Wintersberger.** 1999. Polyomavirus large T antigen binds the transcriptional coactivator protein p300. *J Virol* **73**:1734-9.
237. **Nephew, K. P., and T. H. Huang.** 2003. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* **190**:125-33.
238. **Newbold, R. F., R. W. Overell, and J. R. Connell.** 1982. Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature* **299**:633-5.

239. **Nister, M., T. A. Libermann, C. Betsholtz, M. Pettersson, L. Claesson-Welsh, C. H. Heldin, J. Schlessinger, and B. Westermark.** 1988. Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor-alpha and their receptors in human malignant glioma cell lines. *Cancer Res* **48**:3910-8.
240. **Noda, A., Y. Ning, S. F. Venable, O. M. Pereira-Smith, and J. R. Smith.** 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211**:90-8.
241. **Norbury, C. J., and B. Zhivotovsky.** 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**:2797-808.
242. **Nowell, P. C.** 2002. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* **12**:261-6.
243. **Obaya, A. J., and J. M. Sedivy.** 2002. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **59**:126-42.
244. **Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka.** 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**:1053-8.
245. **Oh, J. M., F. Brichory, E. Puravs, R. Kuick, C. Wood, J. M. Rouillard, J. Tra, S. Kardia, D. Beer, and S. Hanash.** 2001. A database of protein expression in lung cancer. *Proteomics* **1**:1303-19.
246. **Pagano, J. S., M. Blaser, M. A. Buendia, B. Damania, K. Khalili, N. Raab-Traub, and B. Roizman.** 2004. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* **14**:453-71.

247. **Pagano, M., M. Durst, S. Joswig, G. Draetta, and P. Jansen-Durr.** 1992. Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. *Oncogene* 7:1681-6.
248. **Pallas, D. C., V. Cherington, W. Morgan, J. DeAnda, D. Kaplan, B. Schaffhausen, and T. M. Roberts.** 1988. Cellular proteins that associate with the middle and small T antigens of polyomavirus. *J Virol* 62:3934-40.
249. **Pallas, D. C., H. Fu, L. C. Haehnel, W. Weller, R. J. Collier, and T. M. Roberts.** 1994. Association of polyomavirus middle tumor antigen with 14-3-3 proteins. *Science* 265:535-7.
250. **Pallas, D. C., W. Morgan, and T. M. Roberts.** 1989. The cellular proteins which can associate specifically with polyomavirus middle T antigen in human 293 cells include the major human 70-kilodalton heat shock proteins. *J Virol* 63:4533-9.
251. **Pallas, D. C., L. K. Shahrik, B. L. Martin, S. Jaspers, T. B. Miller, D. L. Brautigan, and T. M. Roberts.** 1990. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60:167-76.
252. **Paquis-Flucklinger, V., J. F. Michiels, F. Vidal, C. Alquier, G. Pointis, V. Bourdon, F. Cuzin, and M. Rassoulzadegan.** 1993. Expression in transgenic mice of the large T antigen of polyomavirus induces Sertoli cell tumours and allows the establishment of differentiated cell lines. *Oncogene* 8:2087-94.
253. **Parada, L. F., C. J. Tabin, C. Shih, and R. A. Weinberg.** 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297:474-8.

254. **Pardee, A. B.** 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:1286-90.
255. **Parise, L. V., J. Lee, and R. L. Juliano.** 2000. New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol* **10**:407-14.
256. **Parrinello, S., J. P. Coppe, A. Krtolica, and J. Campisi.** 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* **118**:485-96.
257. **Pawson, T., and T. M. Saxton.** 1999. Signaling networks--do all roads lead to the same genes? *Cell* **97**:675-8.
258. **Peifer, M., and P. Polakis.** 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* **287**:1606-9.
259. **Peitzsch, R. M., and S. McLaughlin.** 1993. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**:10436-43.
260. **Peltomaki, P.** 2001. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* **10**:735-40.
261. **Pepper, M. S., J. C. Tille, R. Nisato, and M. Skobe.** 2003. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res* **314**:167-77.
262. **Pierce, K. L., R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz.** 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:639-50.
263. **Pilon, A. A., P. Desjardins, J. A. Hassell, and A. M. Mes-Masson.** 1996. Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen Rb-binding domain: effects on pRb and p107 binding in vitro and immortalization activity in vivo. *J Virol* **70**:4457-65.

264. **Pilon, A. A., and A. M. Mes-Masson.** 1996. Polyomavirus large T antigen zinc finger is not required for efficient cellular immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virus Res* **46**:171-5.
265. **Plantefaber, L. C., and R. O. Hynes.** 1989. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* **56**:281-90.
266. **Plate, K. H., G. Breier, B. Millauer, A. Ullrich, and W. Risau.** 1993. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* **53**:5822-7.
267. **Player, A., J. Gillespie, T. Fujii, J. Fukuoka, T. Dracheva, D. Meerzaman, K. M. Hong, J. Curran, G. Attah, W. Travis, and J. Jen.** 2003. Identification of TDE2 gene and its expression in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* **107**:238-43.
268. **Polverini, P. J., and S. J. Leibovich.** 1984. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest* **51**:635-42.
269. **Ponder, B. A.** 2001. Cancer genetics. *Nature* **411**:336-41.
270. **Primeau, M., J. Gagnon, and R. L. Momparler.** 2003. Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* **103**:177-84.
271. **Rak, J., J. Filmus, G. Finkenzeller, S. Grugel, D. Marme, and R. S. Kerbel.** 1995. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **14**:263-77.

272. **Rao, D. S., S. V. Bradley, P. D. Kumar, T. S. Hyun, D. Saint-Dic, K. Oravecz-Wilson, C. G. Kleer, and T. S. Ross.** 2003. Altered receptor trafficking in Huntingtin Interacting Protein 1-transformed cells. *Cancer Cell* **3**:471-82.
273. **Rassoulzadegan, M., P. Leopold, J. Vailly, and F. Cuzin.** 1986. Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strains. *Cell* **46**:513-9.
274. **Rassoulzadegan, M., Z. Naghashfar, A. Cowie, A. Carr, M. Grisoni, R. Kamen, and F. Cuzin.** 1983. Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:4354-8.
275. **Ravitz, M. J., and C. E. Wenner.** 1997. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res* **71**:165-207.
276. **Renan, M. J.** 1993. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* **7**:139-46.
277. **Resh, M. D.** 1994. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **76**:411-3.
278. **Resnick-Silverman, L., Z. Pang, G. Li, K. K. Jha, and H. L. Ozer.** 1991. Retinoblastoma protein and simian virus 40-dependent immortalization of human fibroblasts. *J Virol* **65**:2845-52.
279. **Riley, M. I., W. Yoo, N. Y. Mda, and W. R. Folk.** 1997. Tiny T antigen: an autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *J Virol* **71**:6068-74.

280. **Rodier, F., R. Bertrand, M. Bossolasco, and A. M. Mes-Masson.** 2000. Polyomavirus large T-antigen protects mouse cells from Fas-, TNF-alpha- and taxol-induced apoptosis. *Oncogene* **19**:6261-70.
281. **Ronot, X., A. Doisy, and P. Tracqui.** 2000. Quantitative study of dynamic behavior of cell monolayers during in vitro wound healing by optical flow analysis. *Cytometry* **41**:19-30.
282. **Roskoski, R., Jr.** 2004. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:1-11.
283. **Rowley, J. D.** 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**:290-3.
284. **Royle, S. J., and R. D. Murrell-Lagnado.** 2003. Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays* **25**:39-46.
285. **Rudnick, D. A., C. A. McWherter, G. W. Gokel, and J. I. Gordon.** 1993. MyristoylCoA:protein N-myristoyltransferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **67**:375-430.
286. **Ruley, H. E.** 1983. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**:602-6.
287. **Ruther, U., C. Garber, D. Komitowski, R. Muller, and E. F. Wagner.** 1987. Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* **325**:412-6.
288. **Sakaguchi, K., J. E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C. W. Anderson, and E. Appella.** 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**:2831-41.

289. **Salomon, D. S., R. Brandt, F. Ciardiello, and N. Normanno.** 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**:183-232.
290. **Samuels-Lev, Y., D. J. O'Connor, D. Bergamaschi, G. Trigiante, J. K. Hsieh, S. Zhong, I. Campargue, L. Naumovski, T. Crook, and X. Lu.** 2001. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* **8**:781-94.
291. **Santarosa, M., and A. Ashworth.** 2004. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* **1654**:105-22.
292. **Santiago, F., E. Clark, S. Chong, C. Molina, F. Mozafari, R. Mahieux, M. Fujii, N. Azimi, and F. Kashanchi.** 1999. Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J Virol* **73**:9917-27.
293. **Sawada, S., M. Yoshimoto, E. Odintsova, N. A. Hotchin, and F. Berditchevski.** 2003. The tetraspanin CD151 functions as a negative regulator in the adhesion-dependent activation of Ras. *J Biol Chem* **278**:26323-6.
294. **Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, and P. M. Howley.** 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**:495-505.
295. **Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-36.
296. **Schlessinger, J.** 1993. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* **18**:273-5.

297. **Schmidt, L., F. M. Duh, F. Chen, T. Kishida, G. Glenn, P. Choyke, S. W. Scherer, Z. Zhuang, I. Lubensky, M. Dean, R. Allikmets, A. Chidambaram, U. R. Bergerheim, J. T. Feltis, C. Casadevall, A. Zamarron, M. Bernues, S. Richard, C. J. Lips, M. M. Walther, L. C. Tsui, L. Geil, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, J. Lipan, L. Slife, H. Brauch, J. Decker, G. Niehans, M. D. Hughson, H. Moch, S. Storkel, M. I. Lerman, W. M. Linehan, and B. Zbar.** 1997. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* **16**:68-73.
298. **Schraufstatter, I. U., M. Burger, R. C. Hoch, Z. G. Oades, and H. Takamori.** 1998. Importance of the carboxy-terminus of the CXCR2 for signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* **244**:243-8.
299. **Schuh, A. C., S. J. Keating, F. S. Monteclaro, P. K. Vogt, and M. L. Breitman.** 1990. Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in v-jun transgenic mice. *Nature* **346**:756-60.
300. **Scrabble, H., D. Witte, H. Shimada, T. Seemayer, W. W. Sheng, S. Soukup, A. Koufos, P. Houghton, B. Lampkin, and W. Cavenee.** 1989. Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* **1**:23-35.
301. **Seftor, R. E.** 1998. Role of the beta3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with alpha(v)beta3 integrin expression. *Am J Pathol* **153**:1347-51.
302. **Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe.** 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**:593-602.

303. **Sgambato, A., Y. Doki, I. Schieren, and I. B. Weinstein.** 1997. Effects of cyclin E overexpression on cell growth and response to transforming growth factor beta depend on cell context and p27Kip1 expression. *Cell Growth Differ* **8**:393-405.
304. **Shay, J. W., and I. B. Roninson.** 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **23**:2919-33.
305. **Shay, J. W., and W. E. Wright.** 1989. Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* **184**:109-18.
306. **Sherr, C. J.** 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**:3689-95.
307. **Shigeta, M., N. Sanzen, M. Ozawa, J. Gu, H. Hasegawa, and K. Sekiguchi.** 2003. CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* **163**:165-76.
308. **Shih, C., B. Z. Shilo, M. P. Goldfarb, A. Dannenberg, and R. A. Weinberg.** 1979. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:5714-8.
309. **Shih, C., and R. A. Weinberg.** 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**:161-9.
310. **Shih, L. M., M. Y. Hsu, J. P. Palazzo, and M. Herlyn.** 1997. The cell-cell adhesion receptor Mel-CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma. *Am J Pathol* **151**:745-51.

311. **Shing, Y., J. Folkman, R. Sullivan, C. Butterfield, J. Murray, and M. Klagsbrun.** 1984. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* **223**:1296-9.
312. **Simpson, J. C., R. Wellenreuther, A. Poustka, R. Pepperkok, and S. Wiemann.** 2000. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep* **1**:287-92.
313. **Sinn, E., W. Muller, P. Pattengale, I. Tepler, R. Wallace, and P. Leder.** 1987. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* **49**:465-75.
314. **Sirchia, S. M., M. Ren, R. Pili, E. Sironi, G. Somenzi, R. Ghidoni, S. Toma, G. Nicolo, and N. Sacchi.** 2002. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Res* **62**:2455-61.
315. **Skinner, S. A., P. J. Tutton, and P. E. O'Brien.** 1990. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res* **50**:2411-7.
316. **Skobe, M., and N. E. Fusenig.** 1998. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:1050-5.
317. **Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, and et al.** 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**:707-12.
318. **Slee, E. A., D. J. O'Connor, and X. Lu.** 2004. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* **23**:2809-18.

319. **Sodroski, J. G., C. A. Rosen, and W. A. Haseltine.** 1984. Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science* **225**:381-5.
320. **Soeda, E., J. R. Arrand, N. Smolar, J. E. Walsh, and B. E. Griffin.** 1980. Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* **283**:445-53.
321. **Sporn, M. B.** 1996. The war on cancer. *Lancet* **347**:1377-81.
322. **Srinivasan, A., A. J. McClellan, J. Vartikar, I. Marks, P. Cantalupo, Y. Li, P. Whyte, K. Rundell, J. L. Brodsky, and J. M. Pipas.** 1997. The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol Cell Biol* **17**:4761-73.
323. **Stampfer, M. R., and P. Yaswen.** 2003. Human epithelial cell immortalization as a step in carcinogenesis. *Cancer Lett* **194**:199-208.
324. **Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop, and P. K. Vogt.** 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**:170-3.
325. **Stevens, F. J., and Y. Argon.** 1999. Protein folding in the ER. *Semin Cell Dev Biol* **10**:443-54.
326. **Stewart, M., H. Turley, N. Cook, F. Pezzella, G. Pillai, D. Ogilvie, S. Cartlidge, D. Paterson, C. Copley, J. Kendrew, C. Barnes, A. L. Harris, and K. C. Gatter.** 2003. The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology* **43**:33-9.

327. **Stewart, T. A., P. K. Pattengale, and P. Leder.** 1984. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* **38**:627-37.
328. **Stipp, C. S., T. V. Kolesnikova, and M. E. Hemler.** 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* **28**:106-12.
329. **Strasser, A., A. W. Harris, M. L. Bath, and S. Cory.** 1990. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* **348**:331-3.
330. **Stroeken, P. J., E. A. van Rijthoven, E. Boer, D. Geerts, and E. Roos.** 2000. Cytoplasmic domain mutants of beta1 integrin, expressed in beta 1-knockout lymphoma cells, have distinct effects on adhesion, invasion and metastasis. *Oncogene* **19**:1232-8.
331. **Stupack, D. G., and D. A. Cheresh.** 2002. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* **115**:3729-38.
332. **Sung, V., J. T. Stubbs, 3rd, L. Fisher, A. D. Aaron, and E. W. Thompson.** 1998. Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins. *J Cell Physiol* **176**:482-94.
333. **Sutherland, J. E., and M. Costa.** 2003. Epigenetics and the environment. *Ann N Y Acad Sci* **983**:151-60.
334. **Suzuki, M., S. Okuyama, S. Okamoto, K. Shirasuna, T. Nakajima, T. Hachiya, H. Nojima, S. Sekiya, and K. Oda.** 1998. A novel E2F binding protein with Myc-type HLH motif stimulates E2F-dependent transcription by forming a heterodimer. *Oncogene* **17**:853-65.

335. **Sweet, B. H., and M. R. Hilleman.** 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* **105**:420-7.
336. **Tang, Y., Z. Chen, D. Ambrose, J. Liu, J. B. Gibbs, J. Chernoff, and J. Field.** 1997. Kinase-deficient Pak1 mutants inhibit Ras transformation of Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **17**:4454-64.
337. **Tanner, M. M., S. Grenman, A. Koul, O. Johannsson, P. Meltzer, T. Pejovic, A. Borg, and J. J. Isola.** 2000. Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **6**:1833-9.
338. **Temin, H. M., and H. Rubin.** 1958. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology* **6**:669-88.
339. **Teodori, L., M. L. Trinca, W. Goehde, J. Hemmer, F. Salvati, G. Storniello, and F. Mauro.** 1990. Cytokinetic investigation of lung tumors using the anti-bromodeoxyuridine (BUdR) monoclonal antibody method: comparison with DNA flow cytometric data. *Int J Cancer* **45**:995-1001.
340. **Thompson, W. D., K. J. Shiach, R. A. Fraser, L. C. McIntosh, and J. G. Simpson.** 1987. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol* **151**:323-32.
341. **Tomek, S., P. Horak, I. Pribill, G. Haller, M. Rossler, C. C. Zielinski, D. Pils, and M. Krainer.** 2004. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines is overcome by co-treatment with cytotoxic drugs. *Gynecol Oncol* **94**:107-14.
342. **Treisman, R., U. Novak, J. Favaloro, and R. Kamen.** 1981. Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle-T protein. *Nature* **292**:595-600.

343. **Tsukahara, T., M. Kannagi, T. Ohashi, H. Kato, M. Arai, G. Nunez, Y. Iwanaga, N. Yamamoto, K. Ohtani, M. Nakamura, and M. Fujii.** 1999. Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J Virol* **73**:7981-7.
344. **Udagawa, T., A. Fernandez, E. G. Achilles, J. Folkman, and R. J. D'Amato.** 2002. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *Faseb J* **16**:1361-70.
345. **Ueda, H., T. Manda, S. Matsumoto, S. Mukumoto, F. Nishigaki, I. Kawamura, and K. Shimomura.** 1994. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. *J Antibiot (Tokyo)* **47**:315-23.
346. **Ueda, H., H. Nakajima, Y. Hori, T. Fujita, M. Nishimura, T. Goto, and M. Okuhara.** 1994. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. *J Antibiot (Tokyo)* **47**:301-10.
347. **Ueda, H., H. Nakajima, Y. Hori, T. Goto, and M. Okuhara.** 1994. Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:1579-83.
348. **Van Speybroeck, L.** 2002. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci* **981**:61-81.

349. **Vaux, D. L., S. Cory, and J. M. Adams.** 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**:440-2.
350. **Venema, J., A. van Hoffen, V. Karcagi, A. T. Natarajan, A. A. van Zeeland, and L. H. Mullenders.** 1991. Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. *Mol Cell Biol* **11**:4128-34.
351. **Verma, M., and S. Srivastava.** 2002. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol* **3**:755-63.
352. **Villanueva, A., C. Garcia, A. B. Paules, M. Vicente, M. Megias, G. Reyes, P. de Villalonga, N. Agell, F. Lluís, O. Bachs, and G. Capella.** 1998. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* **17**:1969-78.
353. **Vinals, F., and J. Pouyssegur.** 1999. Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol* **19**:2763-72.
354. **Vlodavsky, I., and Y. Friedmann.** 2001. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* **108**:341-7.
355. **Vlodavsky, I., O. Goldshmidt, E. Zcharia, R. Atzmon, Z. Rangini-Guatta, M. Elkin, T. Peretz, and Y. Friedmann.** 2002. Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol* **12**:121-9.
356. **Vlodavsky, I., O. Goldshmidt, E. Zcharia, S. Metzger, T. Chajek-Shaul, R. Atzmon, Z. Guatta-Rangini, and Y. Friedmann.** 2001. Molecular properties

- and involvement of heparanase in cancer progression and normal development. *Biochimie* **83**:831-9.
357. **Vogelstein, B., and K. W. Kinzler.** 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**:789-99.
358. **Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine.** 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**:307-10.
359. **Vogt, P. K.** 1971. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology* **46**:939-46.
360. **Vousden, K. H., and X. Lu.** 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**:594-604.
361. **Wang, E.** 1995. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* **55**:2284-92.
362. **Wang-Wuu, S., S. Soukup, E. Ballard, B. Gotwals, and B. Lampkin.** 1988. Chromosomal analysis of sixteen human rhabdomyosarcomas. *Cancer Research* **48**:983-7.
363. **Waterman, M. J., E. S. Stavridi, J. L. Waterman, and T. D. Halazonetis.** 1998. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**:175-8.
364. **Wieser, R. J., S. Schutz, G. Tschank, H. Thomas, H. P. Dienes, and F. Oesch.** 1990. Isolation and characterization of a 60-70-kD plasma membrane glycoprotein involved in the contact-dependent inhibition of growth. *J Cell Biol* **111**:2681-92.
365. **Witz, I. P.** 2002. The tumour microenvironment--introduction. *Semin Cancer Biol* **12**:87-8.

366. **Wong, N. C., B. M. Mueller, C. F. Barbas, P. Ruminski, V. Quaranta, E. C. Lin, and J. W. Smith.** 1998. Alphav integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* **16**:50-61.
367. **Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui, and L. A. Liotta.** 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**:1529-37.
368. **Woodring, P. J., and J. C. Garrison.** 1996. Transformation of Rat-1 fibroblasts with the v-src oncogene induces inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase expression. *Biochem J* **319** (Pt 1):73-80.
369. **Wright, A., and S. L. Morrison.** 1997. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* **15**:26-32.
370. **Wyllie, A. H., J. F. Kerr, and A. R. Currie.** 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**:251-306.
371. **Xu, J., C. Ji, L. Wang, Y. Cao, J. Dai, X. Ye, L. Zeng, Q. Wu, Y. Xie, and Y. Mao.** 2003. Cloning and expression of a novel human C5orf12 gene*, a member of the TMS_TDE family. *Mol Biol Rep* **30**:47-52.
372. **Yang, P., Z. Sun, M. C. Aubry, F. Kosari, W. Bamlet, C. Endo, J. R. Molina, and G. Vasmatazis.** 2004. Study design considerations in clinical outcome research of lung cancer using microarray analysis. *Lung Cancer* **46**:215-26.
373. **Yarden, Y., and M. X. Sliwkowski.** 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:127-37.
374. **Yasui, W., N. Oue, S. Ono, Y. Mitani, R. Ito, and H. Nakayama.** 2003. Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **983**:220-31.

375. **Zimmermann, K. C., C. Bonzon, and D. R. Green.** 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**:57-70.
- 376 **G.M. Cooper.** *Oncogenes*. 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers. (1995).
- 377 **Folkman J.** Angiogenesis. In : Jaffe EA, editor. *Biology of endothelial cells*. Boston, MA : Nijhoff; 1984. p. 412-28.
- 378 **Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C. Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III.** *Cancer Medecine*. 6th ed. Kufe, Emil, editors. Hamilton (Canada) : BC Decker Inc; c2003.
- 379 **Zhang M., Yu L., Wu Q., Zheng L.H., Wei Y.H., Wan B., Zhao S.Y. (2003).**
« Identification and characterisation of TDE2, a plasma-membrane protein with 11 transmembrane helices, and its variable expression in human lung cancer and liver cancer tissues. » Submitted to database EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- 380 **Paget, S. 1989.** The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8** :98 -101.